

# **HUMÁN TRIPSZIN 4:**

## **BETEKINTÉS A SZERIN PROTEÁZ AKTIVÁCIÓ ÉS**

### **KATALÍZIS MOLEKULÁRIS VILÁGÁBA**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Gombos Linda

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető: Dr. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Dr. Gráf László

Témavezetők:

Dr. Szilágyi László, egyetemi docens

Dr. Gráf László, egyetemi tanár



Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológiai Intézet

Biokémiai Tanszék

Budapest, 2008

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki mindenekelőtt témavezetőimnek, Dr. Szilágyi Lászlónak és Dr. Gráf Lászlónak, akik irányítása alatt érdekes tudományos kérdésekkel foglalkozhattam. Köszönöm mindkettőjüknek a tőlük kapott tudást és szemléletet.

Köszönettel tartozom Dr. Gráf László és Dr. Nyitrai László tanszékvezetőknek, amiért lehetővé tették munkámat a Biokémiai Tanszéken.

Köszönöm Dr. Kardos Józsefnek az önzetlen segítséget és a sok biztatást.

Köszönettel tartozom Dr. Málnási-Csizmadia Andrásnak, hogy bevezetett a tranziens kinetika világába, valamint Dr. Kovách Ildikónak (The Catholic University of America), hogy megismertetett a protonleltár mérésekkel.

Külön köszönettel tartozom Dr. Patthy Andrásnak a munkám során nyújtott segítségéért.

Hálás vagyok Dr. Kovács Mihálynak és Dr. Pál Gábornak, amiért tanácsaikkal segítették munkámat.

Köszönöm Dr. Tóth Júlia, Dr. Medveczky Péter, Dr. Németh Attila, Dr. Fodor Krisztián és Szenthe Borbála munkatársaimnak, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért, tanácsért.

Köszönettel tartozom Simon Zoltánnak, Jelinek Balázsnak és Szenes Áronnak, akikkel együtt dolgoztam munkám során.

Köszönöm Énekes Vilmosnének és Papp Mónikának a sok segítséget, valamint Vörös Juditnak és Porrogi Pálmának az együtt töltött időt.

Hálás vagyok a Biokémiai Tanszék valamennyi dolgozójának, akik mindannyian segítették munkámat. Szívesen fogok visszagondolni a közös kirándulásokra, korcsolyázásokra, borozgatásokra is.

Köszönöm családomnak szeretetüket, segítségüket, támogatásukat.

# TARTALOMJEGYZÉK

Köszönetnyilvánítás.....	2
Tartalomjegyzék .....	3
Rövidítések jegyzéke .....	5
0. Bevezetés .....	7
1. Irodalmi áttekintés .....	8
1.1. A szerin proteázok .....	8
1.2. A tripszinszerű szerin proteázok szerkezete .....	10
1.3. A szerin proteázok aktív helye.....	12
1.3.1. A katalitikus triád és az oxianion lyuk.....	12
1.3.2. A szubsztrátkötő hely és a szubsztrátspecifitás .....	14
1.3.3. A szerin proteázok katalitikus mechanizmusa.....	16
1.4. Szerin proteáz inhibitorok.....	19
1.5. A zimogén aktiváció .....	24
1.5. A tripszinek expressziója és élettani szerepe.....	27
1.6. A humán tripszin 4.....	30
1.6.1. Felfedezés, klónozás .....	30
1.6.2. Genomiális elhelyezkedés és expresszió .....	30
1.6.3. Inhibitor rezisztencia.....	33
1.6.4. Szubsztrátspecifitás.....	34
1.6.5. Az Arg193 szerepe.....	35
1.6.6. Inhibitorok hasítása.....	36
1.6.7. Élettani szerep.....	37
2. Céltkütüzések.....	39
3. Anyagok és módszerek .....	40
3.1. Mutagenézis .....	40
3.2. A rekombináns tripszinogének előállítása .....	42
3.3. A tripszinogén és tripszin mutánsok tisztítása .....	42
3.4. Differenciális pásztázó kalorimetria .....	43
3.5. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia .....	43
3.6. Limitált proteolízis.....	43
3.7. Az N-terminális kémiai módosítása .....	44
3.8. Proflavin kötés .....	45
3.9. Enzimaktivitás mérés .....	45
3.10. Zimogén aktiváció vizsgálata .....	46
3.11. Tranziens kinetika .....	47
3.12. Protonleltár mérések .....	47
4. Eredmények és megbeszélésük.....	49
4.1. A rekombináns fehérjék expressziója és tisztítása.....	49
4.2. A 193-as pozícióban szubsztituált tripszinek kinetikai vizsgálata .....	49
4.2.1. Aktivitás kisméretű, szintetikus szubsztráton .....	49
4.2.2. Inhibíciós vizsgálatok .....	50
4.2.3. Aktivitás fehérje szubsztráton: kimotripszinogén aktiváció .....	52
4.2.4. Megbeszélés.....	53
4.3. A vad típusú humán tripszin 4 és R193G mutánsa katalitikus ciklusának jellemzése 4-metilumbelliferil 4-guanidinobenzoát (MUGB) szubsztrát analógon ...	54
4.3.1. Előzetes ismereteink .....	54
4.3.2. A gyorskinetikai mérések eredményei.....	55
4.3.3. A reakciót leíró modell .....	59

4.3.4. A vad típusú és az R193G mutáns humán tripszin 4 katalitikus ciklusának összehasonlítása .....	61
4.3.5. Megbeszélés .....	62
4.4. A humán tripszin 1 és 4 protonleltárának összehasonlító vizsgálata .....	65
4.4.1. Elméleti háttér .....	65
4.4.2. Eredmények .....	68
4.4.3. Megbeszélés .....	71
4.5. Az aktivációs domén csuklópánt glicinjei szerepének vizsgálata .....	73
4.5.1. A mutációk kiválasztása .....	73
4.5.2. A rekombináns fehérjék szerkezetének jellemzése .....	74
4.5.3. Limitált proteolízis .....	76
4.5.4. Az N-terminális kémiai módosítása .....	79
4.5.5. Proflavin kötés .....	82
4.5.6. Egyensúlyi aktivitás .....	83
4.5.7. Tranziens kinetika .....	85
4.5.7. Megbeszélés .....	90
5. Összefoglalás .....	97
6. Summary .....	99
A dolgozat alapjául szolgáló közlemények .....	101
Irodalomjegyzék .....	102

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A.U.	Önkényes egység
APPI	Alzheimer prekursor protein inhibitor domén
BA	Benzamidin
BPTI	Szarvasmarha pankreatikus tripszin inhibitor
C-	Karboxi-
CD	Cirkuláris dikroizmus
DFP	diizopropilfluorofoszfát
DNS	Dezoxiribonukleinsav
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilén-diamin-tetraacetát
ELISA	Enzimjelzéses immunszorbens esszé
EST	[Rövid szekvencia részlet, melyet cDNS részleges szekvenálásával nyertek]
Fmoc	9-fluorenilmetoxikarbonil
FPLC	Gyors fehérje folyadékkromatográfia
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetánszulfonsav
HMP	4-hidroximetilfenoximetil-kopolisztirén-1% divinilbenzén gyanta
HPLC	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
hPSTI	Humán pankreatikus szekretoros tripszin inhibitor
IPTG	Izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktozid
kb	Kilobázis
$k_{\text{cat}}$	Átviteli szám
$K_M$	Michaelis-konstans
$k_{\text{obs}}$	Megfigyelt sebességi állandó
LB	Luria-Bertani

MASP	Mannózkötő lektin asszociált szerin proteáz
MBP	Mielin bázikus fehérje
MBP	Mielin bázikus fehérje
Me	N-metil
MMP	Mátrix metalloproteáz
mRNS	Hírvivő ribonukleinsav
MUB	4-metilumbelliferon
MUGB	4-metilumbelliferil 4-guanidinobenzoát
N-	Amino-
PABA	p-aminobenzamidin
PAGE	Poliakrilamid gélelektroforézis
PAR	Proteáz aktivált receptor
PCR	Polimeráz láncreakció
pI	Izoelektromos pont
PMSF	Fenilmetilszulfonilfluorid
p-NA	p-nitroanilid
rpm	Percenkénti fordulatszám
SDS	Nátrium dodecil szulfát
STI	Szójabab tripszin inhibitor
Suc	N-szukcinil
t-	Szöveti típusú
TCR	T-sejt receptor
TLCK	Tozil-L-lizin klórmetil keton
Tricin	N-trisz[hidroximetil]metilglicin; N-[2- hidroxi-1,1-bisz(hidroximetil)etil]-glicin
Tris	Trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán
try	Tripszin
u-	Urokináz típusú
UV	Ibolyántúli
vt	Vadtípusú
Z	Benziloxi-karbonil
$\alpha$ 1-AT	$\alpha$ 1-antitripszin

## 0. BEVEZETÉS

Kühne 1867-ben felismerte, hogy a hasnyálmirigy váladéka képes fehérjék lebontására, és az aktivitásért felelős anyagot tripszinnek nevezte el (Kühne, 1867). Az enzim elnevezést is Kühne alkotta meg, és felismerte, hogy az enzimeknek nem csupán élettani jelentősége nagy, hanem a fehérjék tanulmányozása szempontjából is fontosak. Az azóta eltelt mintegy másfél évszázad során a tripszin a szerin proteázok működésének vizsgálata során modellrendszerül szolgált. Ezen túlmenően a felhalmozódott nagymennyiségű szerkezeti és biokémiai adat lehetővé tette, hogy a tripszinen a fehérjék szerkezete és funkciója közti összefüggéseket általánosságban is vizsgálják.

Több mint száz évvel a tripszin első leírását követően fedeztek fel egy különleges tripszint, melyet ma humán tripszin 4-nek nevezünk. Ez az enzim számos tulajdonságában eltér más tripszinektől: Egyedülálló a genomialis elhelyezkedése, és nem rendelkezik felismerhető szignálszekvenciával. Aktivitása rövid, szintetikus szubsztrátokon kismértékben különbözik más tripszinekétől, nagyméretű, fehérjetermészetű szubsztrátokon ellenben drasztikus a különbség. A kanonikus inhibitorokkal szemben rezisztens, illetve hasítja őket. Mindezen különbségek egyetlen glicin/arginin cseréire vezethetők vissza a 193-as pozícióban.

A szerin proteázok szerkezetét általában katalitikus, szubsztrátkötő és zimogén aktivációs részekre osztják (Kraut, 1977). A 193-as pozíció azonban különleges módon mindhárom strukturális elemnek tagja: részt vesz az átmeneti állapotot stabilizáló oxianion lyuk kialakításában, része az S2' szubsztrátkötő zsebnak, valamint a zimogén aktivációs domén egyik fontos csuklópántja is. A humán tripszin 4 tehát egyedülálló módon felhívja figyelmünket arra, hogy bármennyire is kényelmes az egyes fehérje funkciók elkülönített vizsgálata, a különböző funkciók szorosan összefüggének egymással. Így a fehérjék működését csak akkor érthetjük meg a maga teljességében, ha ezt vizsgálataink során figyelembe vesszük.

Doktori munkám során a szerin proteázok működésének különböző aspektusait — a katalitikus mechanizmust, a szubsztrátkötést, valamint az inaktív/aktív konformációs átalakulást — vizsgáltam a humán tripszin 4 példáján. Ehhez olyan módszereket alkalmaztam, mint az irányított mutagenézis, egyensúlyi és gyorskinetika, protonleltár, valamint különböző szerkezeti próbák.

# 1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 1.1. A szerin proteázok

A proteázok gyakorlatilag valamennyi fiziológiás folyamatban szerepet játszanak. Szerepük fontosságát alátámasztja az a tény is, hogy a legtöbb szervezet génjeinek megközelítőleg 2%-a proteázt kódol, egyedül a transzkripció faktorok száma nagyobb. Működésük alapján a proteázokat négy családba sorolják: aszpartát proteázok, cisztein proteázok, szerin proteázok és metalloproteázok.

Az összes proteáz mintegy harmada a szerin proteázok közé tartozik. Ezekben egy szerin hidroxil csoportja intéz nukleofil támadást a hasítandó peptidkötés ellen (Barrett és mtsai, 1998; Hedstrom, 2002). Ezen felül a katalitikus apparátus általában magában foglal még egy általános bázist, többnyire egy hisztidint is. A szerin proteázok túlnyomó többsége hét klánba sorolható a harmadlagos szerkezet és a katalitikus aminosavaknak a szekvenciában való sorrendje alapján. Az SA, SB, SC és SH klánokban — melyek tipikus képviselői rendre a tripszin, a szubtilizin, a karboxipeptidáz A és a kazeinolitikus proteáz — evolúciósan független utakon katalitikus triád alakult ki (Rawlings és Barrett, 2000). Ezen enzimekben az általános bázis egy hisztidin. A szubsztrát hidrolízisben a katalitikus szerinen és hisztidinen kívül egy aszparaginsav is részt vesz, melynek a hisztidin imidazol gyűrűjének orientációjában van szerepe. Nemrégiben ettől eltérő katalitikus apparátussal rendelkező szerin proteázokat is felfedeztek (Dodson és Wlodawer, 1998). Az SH klánban szintén katalitikus triádot találunk, ám ennek harmadik tagja a szerin és a hisztidin mellett egy további szerin. Az SE és SF klánokban csupán két aminosav vesz részt a katalízisben: vagy egy szerin és egy hisztidin, vagy pedig a szerin mellett egy lizin tölti be az általános bázis szerepét. Végül a TA klánban az N-terminális szerin vagy treonin a nukleofil.

A szerin proteáz klánokat tovább osztják mintegy negyven családba aminosavsorrendjük összehasonlítása alapján (Rawlings és Barrett, 2000). Az S1 család, melynek tipikus képviselője a tripszin, általában véve a proteázok legnagyobb családjá mind az ismert fehérjeszekvenciák (a MEROPS adatbázis több mint 6000 szekvenciát tartalmaz), mind pedig a különböző proteáz aktivitások tekintetében.

Az S1 családról és általánosságban a szerin proteázokról való ismereteink nagyrészt a tripszin tanulmányozásán alapulnak (Perona és Craik, 1995). Továbbá



valamennyi az S1 családba tartozó szerin proteáz egy triptikus specificitású, emésztő funkciót ellátó közös őstől ered (de Haën és mtsai, 1975; Neurath, 1984). Ma a tripszinszerű szerin proteázok számos különböző organizmusban jelen vannak — baktériumokban, gombákban és állatokban is —, és az evolúció során a legkülönbözőbb specializált feladatok elvégzésére szakosodtak olyan alapvető élettani folyamatokban, mint a hemosztázis, immunvédekezés, jelátvitel, apoptózis, reprodukció, fejlődés és differenciálódás (1. táblázat).

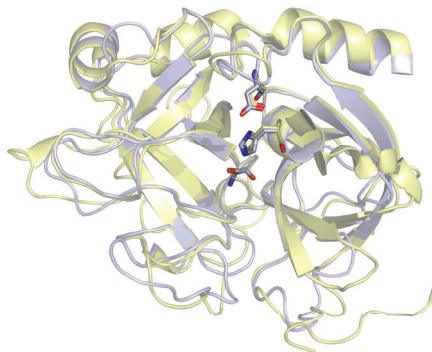
<b>Emésztés</b>	Tripszin Kimotripszin Pankreatikus elasztáz
<b>Véralvadás</b> (Green, 2006)	Véraladási faktorok VIIa, IXa, Xa és XIIa Trombin Protein C
<b>Fibrinolízis</b> (Collen és Lijnen, 1986)	u-Plazminogén aktivátor t-Plazminogén aktivátor Plazmin Kallikrein
<b>Immunválasz</b> (Sim és Laich, 2000)	Komplement faktorok B, D és I Komplement komponensek C1r, C1s és C2 MASP 1, 2 és 3 Hízósejt triptáz Kimáz Katepszin G Neutrofil elasztáz
<b>Jelátvitel</b> (Oikonomopoulou és mtsai, 2006)	Trombin Véraladási faktorok VIIa és Xa Hízósejt triptáz Neutrofil proteináz 3 Tripszin Easter peptidáz Snake peptidáz
<b>Apoptózis</b> (O'Connell és Stenson-Cox, 2007)	Granzim A és B Omi Apoptotikus protein 24 u-Plazminogén aktivátor
<b>Reprodukció</b> (Jeong és Lee, 2007; Liu, 2007)	Akrozin Prosztata specifikus antigén u-Plazminogén aktivátor t-Plazminogén aktivátor
<b>Fejlődés és differenciálódás</b> (LeMosy és mtsai, 1999; Selvarajan és mtsai, 2001; Zeeuwen, 2004)	Hepatocita növekedési faktor aktivátor Hepatocita növekedési faktor Hízósejt triptáz <i>Stratum corneum</i> kimotriptikus enzim Easter peptidáz Snake peptidáz Kallikrein Plazmin
<b>Bakteriális homológok</b>	Alfa litikus proteáz <i>Streptomyces griseus</i> proteáz A és B

**1. Táblázat A tripszinszerű proteázok néhány jellegzetes képviselője.** A táblázat Hedstrom munkája alapján készült módosításokkal (Hedstrom, 2002). Az irodalmi hivatkozások, amennyiben elérhető, összefoglaló tanulmányokat tartalmaznak; más esetekben eredeti kutatási eredményeket összefoglaló közleményeket.

## 1.2. A tripszinszerű szerin proteázok szerkezete

A tripszinek molekulatömege hozzávetőleg 25 kDa. Bár az aminosav szekvenciában jelentős eltérések lehetnek, az S1 családba tartozó valamennyi enzim térszerkezete erősen konzervált (1. ábra). A tripszinszerű szerin proteázok két, egymásra merőlegesen elhelyezkedő homológ doménből épülnek fel, az aktív hely a két domén

közi hasítékban fekszik. Mindkét domén egy hatszálú antiparallel  $\beta$ -hordót, valamint egy C-terminális  $\alpha$ -hélixet tartalmaz. Az ősi gén feltehetőleg csak egyetlen  $\beta$ -hordót kódolt, majd a kétdoménos szerkezet génduplikáció és –fúzió eredményeképp alakult ki (Lesk és Fordham, 1996). Az amino- és karboxi-terminális doméneket összekötő peptidszakaszt elhagyva a tripszinogén felgombolyodása sikeresen megtörténik *in vitro* körülmények között (Duda és Light, 1982; Higaki és Light, 1986). Ez a megfigyelés alátámasztja azt az elképzelést, amely szerint a szerin proteázok egyes doménjeinek felgombolyodása a fehérjeszintézis során is egymástól függetlenül történik. A térszerkezeten túlmenően a molekula funkcionális részei is — mint a katalitikus triád, illetve ezen aminosavak közvetlen környezete — erősen konzerváltak. Ezt kihasználva degenerált oligonukleotid primereket terveztek a katalitikus szerin és hisztidin aminosavak környezetében található szekvenciárszletekre, majd PCR reakciókban felhasználva tripszineket és hasonló szerin proteázokat azonosítottak számos különböző szervezetben, mint például a human tripszin 4-et emberi agyban (Emi és mtsai, 1986; Sakanari és mtsai, 1989; Tani és mtsai, 1990; Wiegand és mtsai, 1993).



**1. ábra** A szarvasmarha tripszin és a humán trombin egymásra illesztett röntgenkristallográfiás szerkezete. A tripszint kék, míg a trombint sárga szalagmodell ábrázolja, a katalitikus triád elemeit pálcikamodell ábrázolás emeli ki. Az ábra a 2BLV és a 2BVR szerkezetek felhasználásával a PyMOL (DeLano Scientific) programmal készült (DeLano, 2002).

A tripszinek térszerkezetét diszulfidhidak stabilizálják. A diszulfidhidak közül három valamennyi szerin proteázban konzervált (42-58<sup>1</sup>, 168-182, 191-220) beleértve a bakteriális és ízeltlábú tripszineket is (Roach és mtsai, 1997). A gerinchúrosok tripszinjében megjelenik még egy (136-201), majd a gerinces tripszinekben két további diszulfidhíd (22-157, 127-232). A tripszinek evolúciója során tehát a diszulfidhidak száma nőtt. Ezzel ellentétben a humán vonal egy ezt követő csökkenő tendenciát mutat: valamennyi humán tripszin elvesztette a 127-232 diszulfidhidat, ezen felül a humán tripszin 2 a 136-201 diszulfidhidat is.

A tripszineknek egy további szerkezeti jellegzetessége egy nagy affinitású kalciumkötő hely jelenléte, melyet a Glu70-Glu80 hurok peptidgerincének karbonil csoportjai alkotnak (Bode és Schwager, 1975). A kalciumkötés szükséges az enzim stabilitásához, ennek hiányában a tripszin gyors autodegradációt szenved. A kalcium ionok stabilizáló hatása egyes feltételezések szerint a molekula  $\alpha$ -hélix tartalmának növekedésére vezethető vissza, amint ezt víz és etanol elegyében végzett cirkuláris dikroizmus mérések mutatták (Kotormán és mtsai, 2003). A szarvasmarha tripszinben az elsődleges autolízis hely a Lys145-Ser146 peptidkötés, mely az amino- és karboxi terminális doméneket összekötő peptidszakaszban helyezkedik el (autolízis hurok) (Schroeder és Shaw, 1968). További autolízis helyek a Lys188-Asp189, Lys60-Ser61 és Arg117-Val118 peptidkötések (Maroux és Desnuelle, 1969; Smith és Shaw, 1969).

A tripszinek izoelektromos pontja tág határok között változhat (3,9-8,3), a legtöbb fajban több, különböző izoelektromos ponttal rendelkező forma is előfordul (Roach és mtsai, 1997). A kationos és anionos tripszinek funkciójában nem mutattak ki különbséget, bár lehetséges szubsztrátspecifitásbeli eltérés (Fletcher és mtsai, 1987). A kationos és anionos tripszinek összehasonlítása ugyanis felfedte, hogy a töltésbeli eltérések nagyrészt a fehérje C-terminális részén találhatók, ami a szubsztrátkötő helyet alkotja.

### 1.3. A szerin proteázok aktív helye

#### 1.3.1. A katalitikus triád és az oxianion lyuk

A tripszinek aktív helyének legfontosabb aminosavai a peptidkötés hasításában szorosan együttműködő, konzervált His57, Asp102, Ser195 triád. A His57 és Asp102

---

<sup>1</sup> Az aminosavak számozása a szarvasmarha kimotripszinogén számozást követi (Hartley és mtsai, 1965).

aminosavak az N-terminális doménhez tartoznak, míg a Ser195-öt a C-terminális domén tartalmazza. A Ser195 és a His57 vesznek részt közvetlenül a peptidkötés két lépésben, acil transzfer mechanizmussal történő hasításában. A Ser195 hidroxil csoportja intéz nukleofil támadást a hasítandó peptidkötés karbonil szénatomja ellen. A His57 növeli a katalitikus szerin reakcióképességét azáltal, hogy általános bázisként felveszi a Ser195 hidroxil csoportjáról a protont. Az Asp102 karboxil csoportja hidrogén hidat képez a His57-tel, növelve ezáltal annak elektronegativitását, illetve stabilizálja az imidazol gyűrű megfelelő rotamer és tautomer formáját.

A katalitikus triád egy kiterjedt hidrogénhidas hálózat része: hidrogénhidas kapcsolat áll fenn a His57 N $\delta$ 1-H és az Asp102 O $\delta$ 1, az Asp102 O $\delta$ 2 és az Ala56 és His57 peptidgerinc NH, a His57 C $\epsilon$ 1-H és a Ser214 peptidgerinc karbonil, valamint a Ser195 OH és a His57 N $\epsilon$ 2-H között is, bár az utóbbi kötés a His57 protonálódását követően megszűnik. Mivel hasonló hidrogénhidak figyelhetők meg az enzim-inhibitor fizikai komplexben, az acil-enzimben és átmeneti állapot analóggal alkotott komplexben is, feltételezhető, hogy ezek a hidrogénhidak a teljes katalitikus ciklus során jelen vannak (Hedstrom, 2002).

Számos kísérlet megerősíti a katalitikus triád egyes aminosavainak szerepét a szerin proteázok katalízisében. Kezdetben kémiai módosították a katalitikus triád különböző elemeit: a Ser195 hidroxilcsoportjának eltávolításával anhidroproteázt állítottak elő (Weiner és mtsai, 1966), illetve a His57 N $\epsilon$ 2-t metilálták (Nakagawa és Bender, 1970). Mindkét módosítás legalább négy nagyságrenddel csökkenti a proteáz aktivitást (Henderson, 1971; West és mtsai, 1990). A későbbiekben az irányított mutagenézis kísérletek kiterjedtebb vizsgálatokat tettek lehetővé. A Ser195, illetve His57 alaninnal történő helyettesítése a katalitikus hatékonyság öt-hat nagyságrendnyi csökkenését eredményezi (Corey és Craik, 1992). A katalitikus triád további elemeinek szubsztitúciója már nem okoz aktivitásvesztést, vagyis a Ser195 vagy a His57 helyettesítése önmagában is elég a katalitikus triád teljes működésképtelenné tételéhez, jelezve ezáltal a két aminosav közvetlen szerepét a peptidkötés hasításában. Az Asp102 aszparaginnal történő helyettesítése a  $k_{cat}/K_M$  négy nagyságrendnyi csökkenését eredményezi (Craik és mtsai, 1987; Sprang és mtsai, 1987). A katalitikus triád mutánsok megmaradó aktivitása azonban még mindig mintegy három nagyságrenddel magasabb a nem katalizált reakcióhoz viszonyítva. Ez azt mutatja, hogy a szerin proteázok aktivitásához a katalitikus triádon kívül más tényezők is hozzájárulnak, mint

az oxianion lyuk, a deszolvatáció, illetve egyéb szerkezeti elemek, amelyek segítenek az átmeneti állapot stabilizálásában.

Az oxianion lyukat a Gly193 és a Ser195 peptidgerinc amid csoportja alkotja, tehát közvetlen összeköttetésben áll a katalitikus triáddal. Az NH csoportok egy pozitív töltésű zsebet hoznak létre, amely aktiválja a hasadó kötés karbonil csoportját, illetve stabilizálja a tetraédes átmeneti állapot során létrejövő oxianion negatív töltését (Henderson, 1970).

### ***1.3.2. A szubsztrátkötő hely és a szubsztrátspecifititás***

A szubsztrátfelismerő helyet a peptid szubsztrát oldalláncainak kötőzsebei, valamint a polipeptidkötő hely alkotják. A szerin proteázok szubsztrátspecifitását elsősorban a P1-S1<sup>2</sup> kölcsönhatás határozza meg. A további kötőhelyek általában jóval kisebb szerepet játszanak a specificitás kialakításában, viszont a velük való kölcsönhatás fokozza a katalitikus hatékonyságot (Corey és Craik, 1992; Schellenberger és mtsai, 1994). A közvetlenül a Ser195 mellett elhelyezkedő S1 zsebet a 189-192, 214-216 és 224-228 aminosavak alkotják, a specificitásért elsősorban a 189, 216 és 226-os pozícióban található aminosavak felelősek (Perona és Craik, 1995; Czapinska és Otlewski, 1999). A tripszinben az Asp189, Gly216 és Gly226 egy negatívan töltött S1 zsebet alakít ki, így az enzim a bázikus arginin és lizin P1 aminosavak után hasít. A  $k_{cat}/K_M$  e két aminosav esetében legalább  $10^5$ -szer nagyobb, mint más természetes aminosavakra. Arginint tartalmazó szubsztrátok esetén közvetlen kapcsolat alakul ki a szubsztrát guanidino csoportja és az Asp189 karboxil csoportja között, ezzel szemben lizin esetén a kölcsönhatás egy vízmolekula által mediált. Ezt tükrözik a  $k_{cat}/K_M$  értékek is: az arginin iránti preferencia 2-10-szeres a lizinhez viszonyítva (Craik és mtsai, 1985). Az Asp189-nek — a kimotripszinben a megfelelő pozíciót elfoglaló — szerinnel történő szubsztitúciója a  $k_{cat}/K_M$  értékének öt nagyságrendnyi csökkenését eredményezi arginin/lizin szubsztrátokon, anélkül, hogy hidrofób oldalláncú kimotripszin szubsztrátokon megnőne az enzim aktivitása (Gráf és mtsai, 1987; Gráf és mtsai, 1988). A szubsztrátkötő zseb falában elhelyezkedő Gly216 és Gly226 nem gátolják meg

---

<sup>2</sup> Az ún. Schechter-Berger nomenklatúra szerint a proteázok a szubsztrát P1-P1' aminosavai közti kötést hasítják

(Schechter és Berger, 1967). A P1 helyet az amino-terminális irányába haladva követik a P2, P3 stb., míg P1' helyet a karboxi-terminális irányába a P2', P3' stb. helyek. A proteáz felszínén a szubsztrát adott aminosavával kölcsönhatásba lépő helyeket S1, S2, S3 stb., illetve S1', S2', S3' stb. jelöléssel azonosítjuk.

terjedelmesebb oldalláncok behatolását a szubsztrátkötő zsebbe, ellentétben az elasztázal, ahol a megfelelő pozíciókban alanint, illetve valint találunk. A tripszin 216 és 226-os glicinjeinek alaninnal való szubsztitúciója jelentősen megváltoztatja az enzim arginin/lizin specificitását (Craik és mtsai, 1985).

Azon kísérletek sikertelensége, melyek a szubsztrátspecificitást kizárólag az S1 helyet alkotó aminosavak cseréjével próbálták megváltoztatni, arra hívta fel a figyelmet, hogy a szubsztrátspecificitás egy olyan strukturális kapcsolati hálózat eredménye, amely túlterjed az S1 helyen. Az enzim/szubsztrát kölcsönhatások kiterjednek legalább az ún. polipeptidkötő helyre. A polipeptidkötő helyet a 214-216 aminosavak peptidgerince alkotja, amely egy antiparallel  $\beta$ -lemezt képez a peptid szubsztrát P1-P3 aminosavaival. Hidrogénhidás kölcsönhatások alakulnak ki a Ser214 karbonil oxigén és a P1 NH, a Trp215 NH és a P3 karbonil, valamint a Gly216 karbonil és a P3 NH között. A 214-216-os aminosavak alkotják az S1 hely egyik falát is, illetve a Ser214 karbonil csoportja hidrogénhidat képez a His57-tel, miáltal létrejön egy kommunikációs hálózat a polipeptidkötő hely, az S1 hely és a katalitikus triád között.

Az S2-Sn, illetve az S1'-Sn helyek csak kismértékben járulnak hozzá a szubsztrátspecificitás kialakításához, általánosságban azonban elmondható, hogy ezekben a pozíciókban a tripszinek a hidrofób aminosavakat preferálják (Fiedler, 1987; Lopes és mtsai, 2006). Termodinamikai vizsgálatok megmutatták, hogy az S3 hely kivételével, amely érdekes módon elsősorban a katalízisben játszik szerepet, ezen helyek mindegyike fontos szerepet tölt be a szubsztrátkötésben (Marana és mtsai, 2002; Lopes és mtsai, 2006). Ezen túlmenően az Sn' helyek az átmeneti állapot stabilizálásában is részt vesznek.

A szerin proteázok P2-Pn specificitását olyan peptidok felhasználásával vizsgálták, amelyek C-terminális argininjének karboxil csoportjához egy kromofór vagy fluorofór kapcsolódik (McRae és mtsai, 1981; Pozsgay és mtsai, 1981; Juliano és Juliano, 1985). Ezen tanulmányok szerint a tripszinek a P2 pozícióban a prolint preferálják, amely segít a szubsztrát megfelelő illesztésében, mivel mind a P1, mind pedig a P3 pozícióban igen előnytelen. A P3 pozícióban a fenilalanin a tripszinek által legkedveltebb aminosav.

A P1'-Pn' specificitást peptid nukleofilekre történő acil-transzfer reakciókkal, illetve belsőleg kioltott fluoreszcens peptidkönyvtárak felhasználásával vizsgálták (Schellenberger és mtsai, 1993; Schellenberger és mtsai, 1994; Grahn és mtsai, 1998; Grahn és mtsai, 1999). A specificitás strukturális hátterére enzim-inhibitor komplexek

szerkezete alapján következtethetünk (Bode és Renatus, 1997). Mivel azonban az inhibitorok nem az optimális P1'-Pn' aminosavakat tartalmazzák, a P1' aminosavak pontos kölcsönhatásai nem ismertek. A szubsztrát peptidgerincének nyújtott konformációja következtében a P1' és P3' oldalláncok az egyik irányba mutatnak, míg a P2' oldallánc a másik irányba. A P1' és P3' aminosavak az enzim ugyanazon felszínével képezhetnek kölcsönhatást, így a tripszin S1' és S3' specificitása hasonló. Az S1' hely, melyet a 34-41 és az 58-68 hurkok alkotnak, alapvetően hidrofób karakterű, de elektrosztatikus kölcsönhatások is kialakulhatnak. Ennek megfelelően meglehetősen csekély a P1' diszkrimináció, bár a nagyméretű hidrofób aminosavak a preferáltak, elsősorban a metionin. Az S2' helyet a Tyr40 és a 151-es aminosav oldallánca béleli. Az S' helyek legfontosabb kölcsönhatása a Phe41 O és a P2' NH közötti hidrogénhid. A P2' pozícióban a tripszin pozitív töltésű aminosavakat — arginint és lizint — kedvel. A P2' specificitás szerkezeti alapját az S2' zseb negatív töltése adja, mely patkány tripszinben a Glu151 oldallancának, humán tripszin 1-ben a Tyr154-hez kapcsolódó szulfát csoportnak köszönhető (Sahin-Tóth és mtsai, 2006). Más szerin proteázokban, mint például a véralvadási kaskád enzimeiben, az aktív helyet övező hurkokban található inszerciók sokkal jobban definiált S2-Sn, illetve S1'-Sn kötőhelyeket alakíthatnak ki, amelyek alapvetően meghatározzák a specificitást (McRae és mtsai, 1981; Bode és mtsai, 1992).

### ***1.3.3. A szerin proteázok katalitikus mechanizmusa***

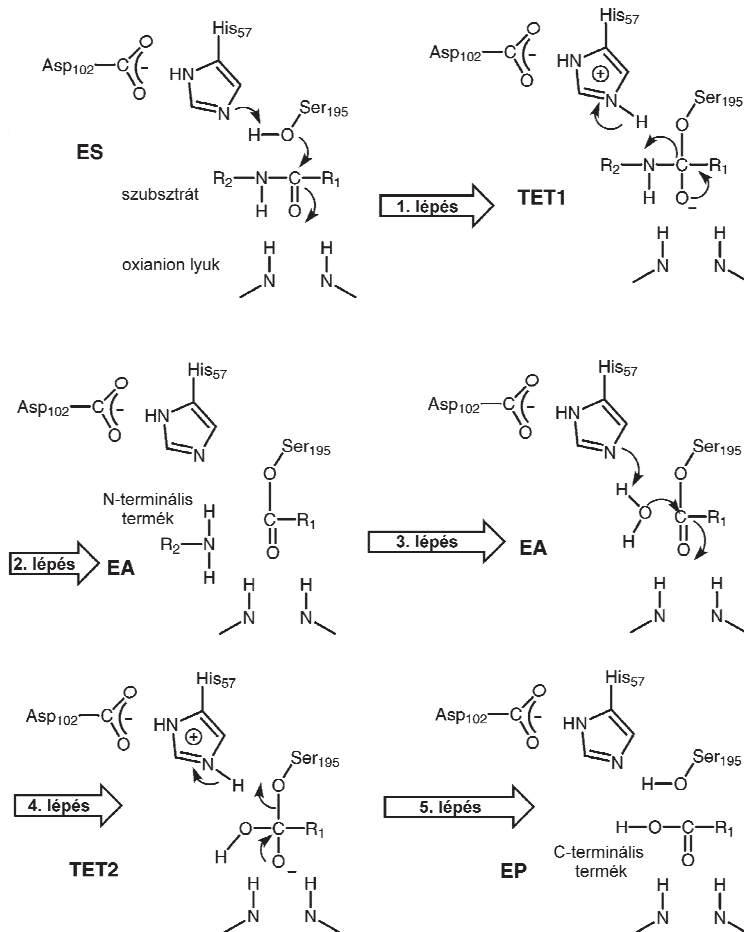
A szerin proteázok alapvető funkciója a fehérjékben található peptidkötések hidrolízise, bár egyéb amid, anilid, észter, illetve tioészter kötések hasítására is képesek. A peptidkötés metastabil képződmény: víz jelenlétében végbemenő spontán hidrolízise során a moláris szabadenergia változás mintegy -10 kJ/mol, vagyis exergonikus folyamat. Ez a reakció azonban igen lassú, felezési ideje kb. hét év (Kahne and Still, 1988). A peptidkötés nagyfokú stabilitása az allil-anion típusú konjugáció következménye, a proteázok működésük során stabilizálják a nagy energiájú, konjugációt nem tartalmazó átmeneti állapotot, leküzdve ezáltal a reakció kinetikai gátját. Az amid kötés aktivációjához rendszerint egy általános sav lép kölcsönhatásba a karbonil oxigénnel. Ezen felül gyakran a peptidkötés proteáz általi torzulása is hozzájárul a rezonancia stabilizáció megszüntetéséhez. A víz maga gyenge nukleofil, ezért a proteázok aktiválják, általában egy általános bázis közreműködésével. Továbbá



az amin gyenge távozócsoport, ezért a proteázok protonálják. Mindezen mechanizmusoknak köszönhetően a szerin proteázok katalitikus hatékonysága kiemelkedő: a reakciósebesség mintegy tíz nagyságrenddel nagyobb a nem katalizált reakcióhoz viszonyítva.

A 2. ábra mutatja a szerin proteázok katalitikus mechanizmusának általános sémáját. A polipeptid szubsztrát megkötődik az enzim felszínén oly módon, hogy a hasítandó kötés az aktív helyre illeszkedik, és a karbonil szén a nukleofil szerin közelébe kerül. A reakció két fő lépésre bontható: az első lépés során kialakul egy kovalens enzim-szubsztrát köztitermék, amely a reakció második lépésében egy katalitikus vízmolekula segítségével bomlik el. Az acilezés során a Ser195 hidroxil csoportja nukleofil támadást intéz a hasítandó peptidkötés karbonil szénatomja ellen, így kialakul egy kovalens tetraédes átmeneti állapot. A nukleofil támadást a His57 általános bázisként segíti: a Ser195 hidroxil csoportjáról proton transzfer történik a His57 N-jére. A keletkező His57-H<sup>+</sup> pozitív töltését, valamint megfelelő rotamer és tautomer formáját az Asp102 stabilizálja (Craik és mtsai, 1987; Sprang és mtsai, 1987). Korábban egy töltés relé rendszert feltételeztek az Asp102 katalízisben betöltött szerepének magyarázatára (Blow és mtsai, 1969). Ezen elmélet szerint a szerin proteázok működése során a katalitikus triád tagjait összekötő hidrogénhidakon keresztül kettős proton transzfer történne a Ser195 hidroxil csoportjáról a His57-re, majd az Asp102-re. A tetraédes átmeneti állapot stabilizálásában igen jelentős szerepet játszik az oxianion zseb azáltal, hogy a Gly193 és a Ser 195 peptidkötésének imino csoportja hidrogén hidat alakít ki a negatívan töltött karbonil oxigén atommal (oxianion). Ily módon a tetraédes átmeneti állapot erősebben kötődik, mint a szubsztrát, tehát a reakció aktiválási energiája csökken a nem katalizált reakcióhoz képest. A tetraédes átmeneti állapot elbomlása során a His57-H<sup>+</sup> általános savként átadja protonját az amin nitrogén atomjának, miáltal a peptidkötés elhasad. Így a tetraédes átmeneti állapot elbomlik acil-enzimre és távozócsoportra.

Az acil-enzim hidrolízise, a dezacilezés gyakorlatilag fordítottja az acilezésnek. Ekkor azonban egy vízmolekula tölti be a nukleofil támadó szerepét, ami egy második tetraédes átmeneti állapot kialakulását eredményezi. Ennek elbomlása során felszabadul a Ser195 és a karboxi-terminális termék.



**2. ábra A szerin proteázok katalitikus mechanizmusa.** ES, Michaelis-komplex; TET1, első tetraéderes átmeneti állapot; EA, kovalens acil-enzim intermedier; TET2, második tetraéderes átmeneti állapot; EP, szabad enzim és termék. Az ábra Ishida és Kato munkája alapján készült (Ishida and Kato, 2003).

Mára a szubsztrát hidrolízis valamennyi intermedierjének atomi szerkezete ismert, melyek illesztésével sikerült a reakciócentrum egyes atomjainak mozgását a teljes katalitikus ciklus során rekonstruálni (Radisky és mtsai, 2006). Így derült fény arra, hogy az enzim működése során igen „gazdaságos” módon a karbonil szénatom,

illetve a hidrolitikus víz mozgása dominál, amit a katalitikus szerin és hisztidin csekély elmozdulásai egészítenek ki.

Kisméretű szintetikus szubsztrátok esetén amidokra rendszerint az acilezés a sebességmeghatározó lépés, míg észterkötés hidrolizisekor a dezacilezés (Zerner és mtsai, 1964; Brouwer és Kirsch, 1982). Mivel a specificitás meghatározásában az acilezés sebessége a meghatározó tényező, észter szubsztrátokon sokkal tágabb a tripszin specificitása, mint peptideken (Hedstrom és mtsai, 1994). Fehérje szubsztrátok esetében az enzimen való megkötődés válhat a sebességmeghatározó tényezővé.

## 1.4. Szerin proteáz inhibitorok

Bármennyire is meglepőnek tűnhet, a legtöbb természetes proteáz inhibitor maga is fehérje. Az ismert endogén inhibitorok minden esetben fehérjetermészetűek, kisméretű, nem fehérjetermészetű inhibitorokat csak mikroorganizmusok termelnek. Ez utóbbiak funkciója a gazdaszervezet proteázainak gátlása. A legtöbb inhibitor a négy mechanisztikus osztálynak (szerin, cisztein, aszpartát és metalloproteázok) csupán egyikére specifikus, léteznek azonban kivételek. Ilyenek az  $\alpha_2$ -makroglobulinok, amelyek emlősök plazmájában, néhány gerinctelen hemolimfájában, valamint madarak és hüllők tojásfehérjéjében található nagyméretű, tetramer glikoproteinek (Jones és mtsai, 1972). Az  $\alpha_2$ -makroglobulin alegységek tartalmaznak egy jól hozzáférhető ún. csali régiót, amely számos proteáz hasítóhelyét tartalmazza (Barrett és Starkey, 1973; Harpel, 1973). A csali régió hasítása olyan konformációváltozást idéz elő az  $\alpha_2$ -makroglobulinban, mely hatására egy szoros komplex alakul ki a proteázzal. Az  $\alpha_2$ -makroglobulin kötött proteáz aktív helye azonban továbbra is hozzáférhető kisméretű szubsztrátok és inhibitorok számára, nagyméretű, fehérjetermészetű partnerek számára ellenben a hozzáférés sztérikusan gátolt (Ganrot, 1966). Ismertek olyan inhibitorok is, melyeknek különböző, nem átfedő kötőhelyeik vannak a különböző katalitikus osztályba tartozó enzimek számára. Így egyaránt gátolnak szerin és metalloproteázokat (Kumazaki és mtsai, 1993; Hiraga és mtsai, 2000), szerin és aszpartát proteázokat (Mares és mtsai, 1989; Ritonja és mtsai, 1990), szerin proteázokat és amilázt (Zemke és mtsai, 1991; Vallee és mtsai, 1998).

A proteáz inhibitorok túlnyomó többsége azonban csak egyetlen katalitikus osztályba tartozó enzim működését képes gátolni; a legtöbb inhibitor szerin proteázokra specifikus. A szerin proteáz inhibitorok szerkezet alapján történő osztályozását

Laskowski és Kato vezette be (Laskowski és Kato, 1980). Időközben azonban újabb és újabb inhibitorok felfedezése révén a csoportok száma egyre nőtt: ma több mint húsz család ismert (Rawlings és mtsai, 2004). Hatásmechanizmusuk alapján az inhibitorokat három típusba sorolhatjuk: kanonikus és nem kanonikus inhibitorok, illetve szterpinek.

A kanonikus inhibitorok nevüket közös, szubsztrátszerű mechanizmusukról kapták (Huber és Bode, 1978; Laskowski és Kato, 1980). Feltételezhetően a produktív módon kötött fehérje szubsztrátok is a kanonikus konformációt veszik fel. A kanonikus inhibitorok viszonylag kisméretű fehérjék (illetve protein domének többfejű inhibitorok esetében): méretük 14-től mintegy 200 aminosavig terjed. Valamennyien rendelkeznek egy jellegzetes, ún. kanonikus konformációjú felszíni reaktív hurokkal, más tekintetben azonban igen eltérő a szerkezetük. Mindamellett magának az inhibitor váznak is vannak bizonyos általános jellemzői: a kanonikus inhibitorok általában — bár nem feltétlenül — kizárólag  $\beta$ -lemezekből állnak vagy  $\alpha/\beta$  proteinek, de minden esetben kompaktak és igen stabilak, és általában egy diszulfidhidakkal stabilizált hidrofób magot tartalmaznak. A reaktív hurok nyújtott helyzetben található, és jellegzetes konformációval bír a P3-P3' régióban (Bode és mtsai, 1987). A reaktív hurkot diszulfidhidak, hidrogénhidak és hidrofób kölcsönhatások hálózata stabilizálja, melynek kialakításában mind a hurok, mind az inhibitor váz elemei részt vesznek. Az inhibitor és az enzim közötti kontaktfelszín gyakorlatilag komplementer, így a komplex kialakulását csak minimális konformációváltozás kíséri (Bode és mtsai, 1987; McPhalen és James, 1988). Továbbá az inhibitor szerkezete a hasítást követően sem változik jelentősen (Betzel és mtsai, 1993; Shaw és mtsai, 1995).

Az enzim és az inhibitor kölcsönhatását egyszerűsített formában a P1-P1' peptidkötés hidrolízis/reszintézis reakciójaként is felírhatjuk:



Ahol E a proteáz, I az intakt inhibitor,  $I^*$  a hasított reaktív peptidkötéssel rendelkező inhibitor,  $E \cdot I$  a stabil komplex. Az enzim/inhibitor kontaktfelszín komplementaritása következtében az asszociáció gyors (a jellemző  $k_{on}$  érték  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). A keletkező enzim/inhibitor komplex jóval stabilabb, mint a Michaelis enzim/szubsztrát komplex: a tipikus  $K_i$  értékek hat-kilenc nagyságrenddel alacsonyabbak, mint a  $K_M$  értékek. A reaktív peptidkötés hasításának  $k_{cat}/K_M$  értéke sok esetben  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  körüli, ami azt mutatja, hogy az inhibitorok jó szubsztrátok (Buczek és mtsai, 2002). Másfelől viszont a hidrolízis katalitikus állandója semleges pH-n szélsőségesen alacsony (Estell

és mtsai, 1980; Musil és mtsai, 1991). A reaktív peptidkötés hidrolízise reverzibilis folyamat, vagyis a hasított inhibitor is aktív és ugyanúgy képes komplexet képezni az enzimmal, mint az intakt forma. A komplex kialakulása során a peptidkötés újrászintetizálódik (Estell és mtsai, 1980). pH 6-on az  $[I]/[I^*]$  (hidrolízis állandó) értéke közel egységnyi, azaz az inhibitor molekulák mintegy 50%-a hasított.

A nem kanonikus inhibitorok N-terminális szegmensük révén lépnek kölcsönhatásba, amely egy rövid parallel  $\beta$ -lemezt alakít ki a proteáz aktív helyével, szemben a kanonikus inhibitorok reaktív hurkával, mely antiparallel  $\beta$ -lemezt képez. A kölcsönhatás erősségét, gyorsaságát, illetve specificitását az aktív hellyel kialakított kontaktuson felül kiterjedt másodlagos interakciók is elősegítik. A nem kanonikus inhibitorok előfordulása vérszívó élőlényekre korlátozódik, ahol véralvadástgátlóként a trombin vagy a Xa faktor működését gátolják. Klasszikus példa a trombin hirudin által történő gátlása (Grutter és mtsai, 1990; Richardson és mtsai, 2000).

A kanonikus inhibitorokhoz hasonlóan a szerpinek (*szerin proteáz inhibitor*) is szubsztrátként lépnek kölcsönhatásba az enzimmal, ebben az esetben azonban egy stabil acil-enzim komplex jön létre a hidrolitikus reakció során. A szerpinet megtaláljuk egészen a vírusoktól az emlősökig, jellemzően előfordulnak a humán plazmában, mint az  $\alpha$ 1-antitripszin, antitrombin, C1 inhibitor. A szerpinek három  $\beta$ -lemezből és nyolc vagy kilenc  $\alpha$ -hélixből felépülő 45-55 kDa molekulatömegű fehérjék (Gettins, 2002). A szerpinek aktív hurka sokkal hosszabb, mint a kanonikus inhibitoroké — átlagosan 17 aminosav — és különböző konformációs állapotokban fordulhat elő. Az aktív inhibitorban az aktív hurok kitett és flexibilis (Elliott és mtsai, 1998), míg a sokkal stabilabb látens konformációs állapotban — amely a cél proteázhoz való kötődés hatására alakul ki — ez a peptidszegmens a középső  $\beta$ -lemez közepébe illeszkedik (Tucker és mtsai, 1995).

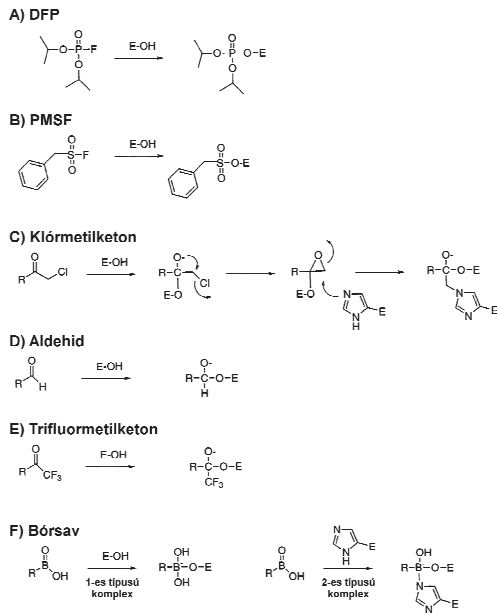
A szerpinek hatásmechanizmusát a következő sémával jellemezhetjük:



ahol E az enzim, I az intakt inhibitor,  $I^*$  a hasított inhibitor,  $E \cdot I$  az enzim-inhibitor komplex,  $E - I$  a tetraédes komplex,  $E \cdot I^*$  az enzim és a hasított inhibitor komplexe. Az első lépésben a proteáz a P1-P1' peptidkötést potenciális szubsztrátként támadja, ekkor még sem az enzim, sem az inhibitor konformációja nem változik, a reaktív hurok konformációja kanonikus (Ye és mtsai, 2001). A katalitikus szerin támadását követően kialakul az acil-enzim komplex. Éles ellentétben a kanonikus

inhibitorokkal a felszabaduló amino csoport könnyen disszociál az aktív helyről. A teljesen flexibilissé váló reaktív hurok a középső  $\beta$ -lemez közepébe illeszkedik, miáltal átfordítja a kovalensen kötött proteázt a szerpin másik oldalára, mintegy 70 Å távolságra eredeti helyétől (Huntington és mtsai, 2000). Az irreverzibilis folyamat során a proteáz molekula mintegy harmada — beleértve az aktív helyet is — súlyosan deformálódik (Kaslik és mtsai, 1997). Így tehát az utolsó lépés rendkívül lassú, a proteáz acil-enzim formában mintegy csapdázódik (Lawrence és mtsai, 1995).

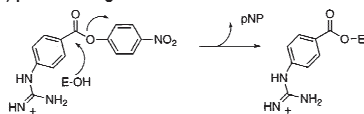
A szerin proteázoknak számos kis molekulás, szintetikus inhibitora létezik, melyeket csoportosíthatunk annak alapján, hogy a katalitikus ciklusba belépve annak melyik lépését blokkolják. Léteznek P1 analóg inhibitorok, melyek reverzibilis módon az enzimhez kötődve egy fizikai komplexet alakítanak ki, így elzárva az enzim aktív helyét a szubsztrát molekulák bekötődése elől. Ilyen pl. a benzamidin, melynek amidin csoportja az arginin guanidino oldalláncának analógja, és hasonló módon sóhidat képez a tripszin szubsztrátkötő zsebe alján lévő 189-es aszparaginsavval. Számos tetraédes átmeneti állapot analóg inhibitor létezik, ezek többsége irreverzibilisen gátol (3. ábra). Ezen inhibitorok oly módon tehetők szelektívvé egy adott enzimmel szemben, hogy a reaktív csoportot egy megfelelő peptidil résszel kombinálják (Powers, 1977; Sampson és Bartlett, 1991). A diizopropilfluorofoszfát (DFP), valamint a fenilmetszulfonilfluorid (PMSF) stabil tetraédes adduktumot képeznek a katalitikus szerinnel. E két inhibitor gyakorlatilag az összes szerin proteázzal reagál, így a gátlás diagnosztikus értékű a családba való besorolás szempontjából. A klórmetyl ketonok — egy epoxid intermedieren keresztül — hemiketált képeznek a 195-ös szerinnel, és alkilálják az 57-es hisztidint. A peptidil aldehidek, a trifluormetyl ketonok és a bórsavak reverzibilis tetraédes adduktumot képeznek a katalitikus szerinnel. Ezen komplexek szerkezete igen közel áll a hidrolízis reakció tetraédes átmeneti állapotához: a His57 protonált, a hemiketál oxigén negatív töltésű és kötődik az oxianion lyukhoz.



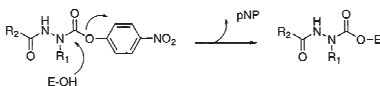
**3. ábra** Tetraédes átmeneti állapot analóg szerin proteáz inhibitorok. Az ábra Hedstrom munkája alapján készült (Hedstrom, 2002).

Végül számos szintetikus inhibitor — a szerpinekhez hasonlóan — stabil acil-enzim intermediert képez, mint a guanidinobenzoát, az azapeptid és az arilakrilóil észterek (4. ábra). A stabilitás alapvetően három tényezőnek köszönhető: az észterek reaktivitását csökkenti a karbonil elektron denzitásának növelése, az acil-enzim sztérikus tényezők következtében nem reagál az oxianion lyukkal, illetve a katalitikus triád torzul és nem képes a víz aktiválására. A jó távozócsoporttal rendelkező guanidinobenzoátok, mint a p-nitrofenil-guanidinobenzoát, illetve a 4-metilumbelliferil guanidinobenzoát alkalmasak aktív hely titrálásra, mivel stabil acil-enzimet képeznek a tripszinnel, és ekvivalens mennyiségű p-nitrofenol, illetve 4-metilumbelliferon szabadul fel (Chase és Shaw, 1967; Jameson és mtsai, 1973).

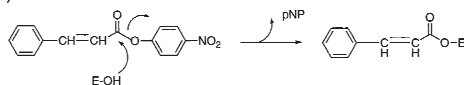
**A) p-nitrofenil-guanidinobenzoát**



**B) Azapeptid észterek**



**C) Arilakriloi észterek**



**4. ábra** Stabil acil-enzimet kialakító szerin proteáz inhibitorok. pNP, p-nitrofenol. Az ábra Hedstrom munkája alapján készült (Hedstrom, 2002).

## 1.5. A zimogén aktiváció

A proteázok inaktív prekursor (zimogén) formájában szintetizálódnak, lehetővé téve ezáltal a proteolitikus aktivitás tér- és időbeni szabályozását, és megakadályozva a nemkívánatos proteolitikus lebomlást (Khan és James, 1998). A zimogének általában egy N-terminális propeptidet tartalmaznak, és ennek proteolitikus eltávolítása hatására alakul ki az aktív enzim. A propeptid az esetek többségében azáltal gyakorol gátló hatást, hogy sztérikusan blokkolja az aktív helyet, megakadályozva ezáltal a szubsztrát megkötődését az enzimen. A tripszin propeptidje ezzel szemben oly módon fejt ki hatását, hogy az inaktív zimogén konformációt stabilizálja, majd a propeptid lehasadása konformációs átrendeződést indít el.

A tripszinek N-terminális szignál- és aktivációs peptidje feltehetően exon keveredés révén kapcsolódott a proteáz domént kódoló génszakasszal az evolúció során (Patthy, 1990). A tripszinek szignálszekvenciája általában tizenöt aminosav hosszúságú, igen konzervált, és az eukariótákra általánosságban jellemző konszenzus szekvenciákat tartalmazza (Roach és mtsai, 1997). Az aktivációs peptid C-terminálisán általában arginin vagy lizin található, melyet három vagy négy negatív töltésű aminosav — többnyire aszparaginsav — előz meg. Az emlősökre jellemző propeptid rendszerint

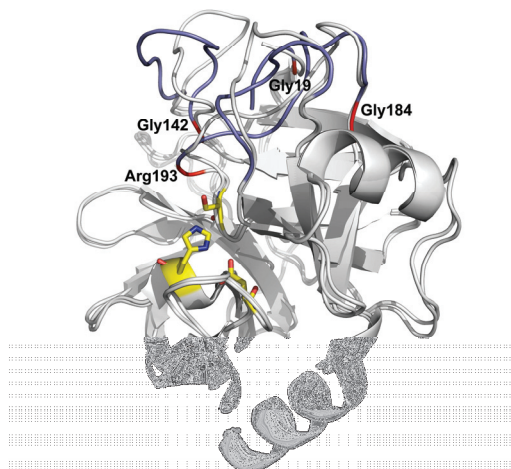


hattagú és az enterokináz felismerő-, illetve hasítóhely (Asp)<sub>4</sub>-Lys konszenzus szekvenciáját tartalmazza. A hasítás következtében felszabadul az új Ile-Val-Gly-Gly N-terminális.

A zimogén és az aktív tripszin szerkezete mintegy 85%-ban megegyezik, beleértve a katalitikus triádot is. A fennmaradó 15% (aktivációs domén) — amely magában foglalja az N-terminális peptidszakaszt a 19. aminosavig, valamint három hurok régiót (142-152, 184-193 és 216-223) — az aktivációt követően konformációs átrendeződésen megy keresztül (Bode és Schwager, 1975; Fehllhammer és mtsai, 1977). Az aktivációs domén része a szubsztrátkötő hely és az oxianion lyuk is, amelyek tehát rendezetlenek a zimogén formában, így a tripszinogén inaktív. Az aktív enzimből az aktivációs domén rendezetté válik, és egy meglehetősen zárt, főleg belső kölcsönhatásokkal rendelkező egységet alkot. Az aktivációs domént az újonnan felszabadult Ile16 amino-terminális és az Asp194 karboxil csoportja közti sóhíd stabilizálja. Erős inhibitor kötése, mint pl. a BPTI, szintén képes a tripszinogénben egy olyan konformációt indukálni, amelyben mind a szubsztrátkötő zseb, mind az Ile16 zseb konformációja aktív enzim szerű, annak ellenére, hogy nincs jelen szabad Ile16 N-terminális (Bode és mtsai, 1978; Pasternak és mtsai, 1999). Hasonló strukturális átrendeződés a másik oldalról is indukálható: a tripszin Ile16 N-terminálisának titrálása vagy kovalens módosítása inaktivációhoz vezet, jelezve ezáltal az Ile16 N-terminális és az aktív hely között fennálló allostérikus kapcsolatot (Fersht, 1971; Spomer és Wootton, 1971; Camire, 2002). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy mind a tripszin, mind a tripszinogén két konformációban — egy inaktív, zimogénszerű és egy aktív, tripszinszerű állapotban — létezik. E két konformáció között egyensúly áll fenn, bár a tripszinogénben ez az egyensúly igen erősen az inaktív konformáció irányába van eltolva ( $K_{eq} = 10^7$  az inaktív konformáció javára), míg a tripszinben az aktív forma van túlsúlyban ( $K_{eq} = 10^2$  az aktív konformáció javára) (Huber és Bode, 1978).

Figyelemreméltó, hogy a hét aminosav közül, melyek az aktivációs domén szegmenseket a molekula rendezett szerkezetű részeivel összekötik, öt glicin. Ez a megfigyelés összhangban van azzal a körülménnyel, hogy a glicin növeli a peptidgerinc flexibilitását, mivel az oldallánc hiánya elősegíti a  $\phi$  és  $\psi$  kötések körüli elfordulást. Molekuladinamikai szimulációk is azt mutatják, hogy ezen glicinek diéderes szögei nagyobb változáson mennek át a tripszinszerű szerin proteázok aktivációs folyamata során, mint a környező aminosavaké (Brünger és mtsai, 1987; Wroblowski és mtsai, 1997; Mátrai és mtsai, 2004). Ezek az eredmények tehát arra utalnak, hogy a glicinek

csuklópántként funkcionálnak az aktivációs domén szegmenseknek az aktivációt követően bekövetkező konformációváltozása során. A szerin proteázok aktivációs domén csuklópánt glicinjeihez igen hasonló működésű glicinek más fehérjékben, pl. nátrium és kálium csatornában is megtalálhatók (Jiang és mtsai, 2002; Zhao és mtsai, 2004; Ding és mtsai, 2005). A csuklópánt glicinek rendkívül konzerváltak a szerin proteázokban. Még olyan fehérjékben is megőrződtek, amelyek térszerkezete a szerin proteázokkal homológ, proteáz aktivitásuk azonban elveszett. Példaként említhető a hepatocita növekedési faktor (Kirchhofer és mtsai, 2007). Ez azt mutatja, hogy a csuklópánt glicinek rendkívül fontos szerepet töltenek be szerkezeti szempontból. A csuklópánt glicinek szerepét az is alátámasztja, hogy valamennyi pozíció közül csak a 193-asra találunk néhány kivételt: a humán tripszin 4-ben a 193-as aminosav arginin (Wiegand és mtsai, 1993; Nyaruhucha és mtsai, 1997) (5. ábra), a patkány tripszin 5-A-ban tirozin (Kang és mtsai, 1992), valamint létezik egy egér tripszin szekvencia (LOC194360), melyet a GenomeScan program prediktált, és szintén Tyr193-at tartalmaz. Ezen felül kígyóméregből izolált trombinszerű enzimek ismertek, melyekben a 193-as pozícióban glicin helyett arginin — *Lachesis muta muta* trombinszerű enzim (Magalhaes és mtsai, 1993), krotaláz (Henschen-Edman és mtsai, 1999), bilineobin (Nikai és mtsai, 1995) —, fenilalanin — *Trimeresurus stejnegeri* plazminogén aktivátor (Braud és mtsai, 2000), flavoxobin (Shieh és mtsai, 1988) —, illetve cisztein — ankrod (Au és mtsai, 1993) — található.



5. ábra A humán tripszin 4 és a szarvasmarha tripszinogén egymásra illesztett szerkezete. A humán tripszin 4 aktivációs domén szegmenseit kék szín jelöli, a katalitikus triád elemei sárga színűek. A 19, 142, 184 és 193-as csuklópozíciókat piros szín jelzi. Az ábra az 1H4W és 1TGN szerkezetek, valamint a PyMOL program (DeLano, 2002) felhasználásával készült.

## 1.5. A tripszinek expressziója és élettani szerepe

Tripszint először pankreatikus folyadékból izolálták (Northrop és Kunitz, 1931). A pankreatikus tripszineket a hasnyálmirigy acinus sejtjei termelik inaktív, zimogén formában. A tripszinogének szekretoros vezikulákban tárolódnak, majd hormonális vagy idegi stimulusra a patkóbélbe ürülnek, ahol részben az enterokináz, részben a már aktiválódott tripszinek által aktiválódnak (Williams, 2006). Fontos funkcióik a táplálék emésztése a patkóbélben, illetve más pankreatikus proenzimek — proteolitikus és lipolitikus proenzimek, úgymint kimotripszinogén, proelasztáz, prokarboxipeptidáz A és B és profoszolipáz — aktiválása.

Tripszinogén azonban nem kizárólag a hasnyálmirigyben termelődik, mivel hasnyálmirigyirtott betegek szérumból is sikerült kimutatni (Itkonen és mtsai, 1996). Sok extrapancreatikus szövetben kimutattak tripszin expressziót, elsősorban hámsejtekben, de más sejtípusokban is. A tripszinogének extrapancreatikus expressziójával, illetve funkciójával kapcsolatban fontos megjegyezni, hogy a legtöbb szövetben termelődik kis mennyiségű enterokinázszerű proteáz (Miyata és mtsai, 1998), valamint a katepszin B is képes tripszinogén aktivációra (Figarella és mtsai, 1988). A

vékonybél nyálkahártyájának szekretoros Paneth-sejtjeiben mind humán tripszin 1, mind humán tripszin 2 jelenlétét kimutatták mRNS és fehérje szinten is (Bohe és mtsai, 1986). Vaszkuláris endoteliális sejtek kultúrában humán tripszin 2-t expresszálnak, amit szintén sikerült mRNS és fehérje szinten is kimutatni (Koshikawa és mtsai, 1997). Northern blot hibridizációval a hasnyálmirigyen kívül a lépben is magas, míg a vékonybélben viszonylag alacsonyabb szintű tripszin expressziót mutattak ki (Koshikawa és mtsai, 1998). *In situ* hibridizációval és immunhisztokémiai módszerekkel számos további szervben is sikerült expressziót kimutatni: a bőr, a nyelőcső, a gyomor, a tüdő, a vese, a máj és az extrahepatikus epevezeték epiteliális sejtjeiben, továbbá a lépben és idegsejtekben. A lépben makrofágok, monociták, illetve a fehér pulpa limfocitái expresszálnak tripszin mRNS-t, míg az agyban a hippocampusz és a nagyagykéreg neuronjai. Egérben zimográfiával a tüdőben, a lépben, a bőrben, a vesében, az agyban, a nyelőcsőben, a gyomorban, illetve a vékony- és a vastagbélben detektáltak tripszin aktivitást. Ugyancsak kimutatták humán tripszin 1 és 2 expresszióját mRNS és fehérje szinten is a teljes férfi genitális traktusban és ondóban (Paju és mtsai, 2000). A tripszin ilyen széleskörű expressziója arra utal, hogy alapvető szerepet tölt be a háms sejtek működésének fenntartásában, az immunvédekezésben, illetve a központi idegrendszerben.

A tripszinek egyik fontos szerepe proteolitikus kaszkádok tagjaként más proenzimek aktivációja, mint a pro-u-plazminogán aktivátor (Koivunen és mtsai, 1989), proMMP-9 (Sorsa és mtsai, 1997; Duncan és mtsai, 1998), -2 (Sorsa és mtsai, 1997), -14 (Will és mtsai, 1996), -1, -3, -8 és -13 (Moilanen és mtsai, 2003), illetve a szerin proteáz prosztata specifikus antigén (PSA) (Paju és mtsai, 2000). Szükséges azonban megjegyezni, hogy az aktivációs kísérletek nagy részét *in vitro* körülmények között végezték, így elképzelhető, hogy *in vivo* biológiai jelentőségük nincs. A tripszinek az extracelluláris mátrix fehérjéinek emésztése, illetve más ezeket bontó proteázok aktiválása révén a sejtvándorlást is elősegítik, így szerepet játszanak fejlődési és regenerációs folyamatokban. Szerin proteázoknak és inhibitoraiknak az idegrendszer fejlődésében betöltött szerepét csirke embriók GnRH-t termelő neuronjainak migrációján vizsgálták (Drapkin és mtsai, 2002). A tripszin kezelés specifikusan elősegítette a sejtek migrációját, ezzel szemben az u-plazminogén aktivátor nem gyakorolt hatást a GnRH neuronok eloszlására. Az inhibitorok közül a nexin-1 nagymértékben, a csirke ovoinhibitor IV kismértékben gátolta a sejtek vándorlását, míg az STI nem befolyásolta. A tripszinek az agyi ischaemiás folyamatokra adott reakcióban

is szerepet játszhatnak (Critchley és mtsai, 2000). Erre utal, hogy patkányokban kísérletesen előidézett szubarachnoidális agyvérzést követően, illetve aneurizmával operált agysebészeti páciensekben a liquor tripszinogén aktivációs peptid (TAP) mennyisége szignifikánsan csökkent. Az enterokinázzal történt aktivációt követően mért TAP koncentráció ekvimoláris a minta tripszinogén tartalmával. Az eredmények háttérében több különböző folyamat is elképzelhető: aktivációs faktorok felszabadulása az ischaemia következtében vagy a tripszinogén mennyiségének csökkenése a celluláris traumát követően.

A szerin proteázok, köztük a tripszinek, jeleket is közvetítenek sejtek számára a G-protein kapcsolt hét transzmembrán hélix receptorok családjába tartozó proteáz aktivált receptorok (PAR) hasítása által (Dery és mtsai, 1998; Macfarlane és mtsai, 2001; Ossovskaya és Bunnnett, 2004). Ily módon részt vesznek a szervezet sérülésekre adott válaszában kialakításában a hemosztázis, a gyulladás, a sejtek túlélése, a fájdalom és a gyógyulás folyamatainak szabályozásával. A PAR családnak négy tagja ismert (PAR-1-4), melyek közül a tripszinek a PAR-2 (Nystedt és mtsai, 1995; Bohm és mtsai, 1996) és a PAR-4 (Kahn és mtsai, 1998; Xu és mtsai, 1998) agonistái. A pankreatikus tripszinek minden valószínűség szerint fiziológiásan is releváns agonistái a vékonybélben található PAR-2 és PAR-4 receptoroknak, mivel a tripszin képes PAR-2 receptorok közvetítésével bélhámsejtek eikozanoid szekrécióját serkenteni, amelyek sokféle sejtípus működését szabályozzák autokrin és parakrin módon (Kong és mtsai, 1997). A pankreatitiszben idő előtt a hasnyálmirigyben aktiválódott tripszin jeleket közvetíthet az acinus sejtek (Bohm és mtsai, 1996), illetve a hasnyálmirigy kivezetőcsövének sejtei (Nguyen és mtsai, 1999) számára. Mivel a PAR-2 és PAR-4 igen sokféle szövetben kifejeződik, elsősorban epiteliális sejtekben, és így expressziójuk nagyrészt átfed a tripszinek extrapankreatikus kifejeződésével, feltételezhetjük, hogy a tripszinek a szervezetben sok helyen fiziológiás agonistái a proteáz aktivált receptoroknak.

A tripszinek számos malignus folyamatban is szerepet játszanak, emelkedett szintű expressziójuk figyelhető meg különféle karcinómák esetén (LaBombardi és mtsai, 1983; Ohta és mtsai, 1994; Terada és mtsai, 1995; Kawano és mtsai, 1997; Oyama és mtsai, 2000). Továbbá a humán tripszin 2-vel homológ TAT-2 expressziós szintje korrelál a malignusság mértékével és a tumor metasztatikus képességével (Koivunen és mtsai, 1990). Ennek mechanizmusa lehet sejtfelszíni receptorok aktivációja, mint növekedési faktor receptorok, integrinek (Burger, 1970; Miyata és

mtsai, 1998), illetve PAR-ok (Alm és mtsai, 2000). A sejtek invazív képessége növelésének másik fontos módja az extracelluláris mátrix lebontása közvetlenül vagy közvetve, más proteázok aktivációja által (Koshikawa és mtsai, 1992; Miyata és mtsai, 1998).

## **1.6. A humán tripszin 4**

### ***1.6.1. Felfedezés, klónozás***

A mezotripszin humán pankreatikus szövetben és folyadékban mutatták ki először mint kis mennyiségben jelenlévő, inhibitor rezisztens tripszin formát (Rinderknecht és mtsai, 1978). Nevét a kationos humán tripszin 1 ( $pI = 6,2$ ) és az anionos humán tripszin 2 ( $pI = 4,9$ ) értékei közé eső izoelektromos pontjáról kapta: a zimogén forma  $pI$  értéke 5,7. Bár a mezotripszinogén gátolhatónak bizonyult a kisméretű, szintetikus TLCK tripszin inhibitorral, feltűnt a legtöbb természetes inhibitorral szembeni rezisztenciája (hPSTI, BPTI, STI) (Rinderknecht és mtsai, 1984).

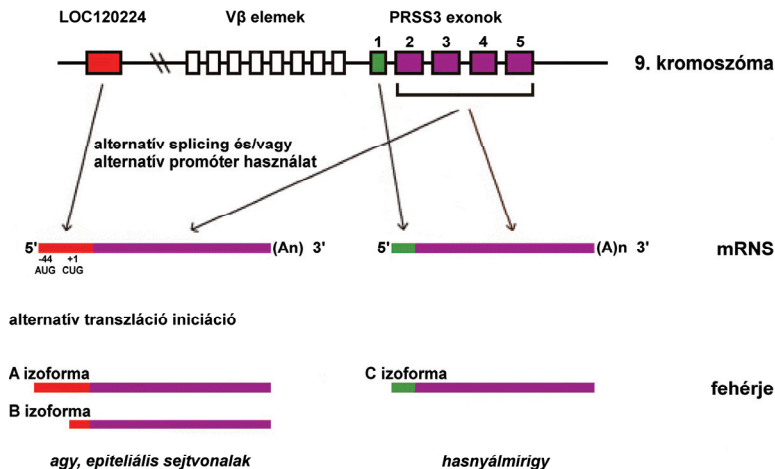
A mezotripszinogént először 1990-ben klónozták tripszinogén III néven, de ez a szekvencia több hibát is tartalmazott (Tani és mtsai, 1990). A helyes szekvenciát 1997-ben írták le (Nyaruhucha és mtsai, 1997). Ezzel egyidőben agyi cDNS könyvtárból is klónoztak egy splice variánst, mely a szekretoros szignálpeptid helyett egy alternatív 1. exont tartalmaz (Wiegand és mtsai, 1993). Az ún. agyi tripszinogént a IV-es sorszámmal illeték, mivel szekvenciája több ponton különbözött a hibákat tartalmazó tripszinogén III szekvenciától. Az elnevezés azonban később is használatban maradt, mivel a mezotripszinogén és az agyi tripszinogén ténylegesen különböző fehérjék, bár a propeptid lehasadását követően kialakuló aktív formák már azonosak (lásd később).

### ***1.6.2. Genomiális elhelyezkedés és expresszió***

A humán tripszinogén gén többsége a 7. kromoszóma q35 régiójában helyezkedik el (Honey és mtsai, 1984; Rowen és mtsai, 1996). A lokusz 5' végén található három nem funkcionáló tripszinogén gén — valamennyi fordított transzkripció orientációban —, míg további öt tripszinogén gén mintegy 5 kb-ra 3' irányban fekszik, a TCR- $\beta$  lokusz konstans és variábilis szakaszai közé ékelődve. Itt található a humán tripszinogén 1-et kódoló PRSS1 és a humán tripszin 2-t kódoló PRSS2 gén, valamint még egy feltételezhetően funkcionális, bár deléciót tartalmazó

tripszinogén gén, melynek alacsony szintű expresszióját sikerült a pajzsmirigyben PCR-rel kimutatni. A tripszinogén gének egér (Honey és mtsai, 1984) és csirke (Wang és mtsai, 1995) esetében is hasonló módon a TCR- $\beta$  lokuszon belül találhatók.

Emberben a mezotripszinogént, illetve a humán tripszin 4-et kódoló PRSS3 gén a 9. kromoszóma p13 régiójában található (6. ábra). A TCR- $\beta$  lokusz 3' szakasza — mely egy tripszinogén és legalább hét V $\beta$  pszeudogént tartalmaz — duplikálódott és a 9. kromoszómára transzlokálódott (Rowen és mtsai, 2005). Itt fuzionált egy olyan génszakasszal, amely ugyancsak szegmentális duplikáció révén a 11. kromoszóma q24 régiójából került a 9. kromoszómára, és a gén többi részétől 42 kb távolságban 5' irányban helyezkedik el. Ez a génszakasz az ismeretlen funkciójú, konzervált transzmembrán fehérjét kódoló LOC120224 gén nem kódoló első exonjából származik. Összehasonlító vizsgálatok megmutatták, hogy az interkromoszomális szegmentális duplikációs események az óvilági majmok és az emberszabásúak fejlődési vonalának szétválása után történtek. A PRSS3 transzkriptumok tehát kétféle 1. exonnal rendelkezhetnek, míg a 2-5. exonok közös génszakaszból íródnak át. Mivel az 1. exon a szignálszekvencia egy részét kódolja, a keletkező tripszinogén izoformák különbözőek. A proszekvencia lehasítását követően kialakuló aktív tripszin formák viszont már azonosak. A mezotripszinogén (C izoforma a SwissProt adatbázisban) az eredeti 1. exon által kódolt szignálszekvenciát tartalmazza. Ezen felül még két fúziós transzkriptum keletkezése prediktálható alternatív splicing, illetve alternatív promóterhasználat révén: a LOC120224 1. exonja fuzionál a tripszinogén gén 2-5. exonjával. Az alternatív 1. exon használatát feltételezhetően az is elősegíti, hogy az 1. intron 5' végén található splice hely defektív (GCGAGT) (Rowen és mtsai, 2005). A hosszabb A izoforma egy 72 tagú szignálszekvenciával rendelkezik, míg a rövidebb B izoforma egy 28 aminosavból álló szignálszekvenciával. Az A forma translációja egy AUG kodonról indul, a B izoformáé azonban egy belső CUG kodonról (Németh és mtsai, 2007).



6. ábra A humán tripszinogén 4 izoformák kialakulása. A gén eredeti 1. exonját lila szín jelöli, az alternatív 1. exont piros, míg a 2-5. exonokat lila szín jelöli. Az ábra Tóth és munkatársai munkája alapján készült (Tóth és mtsai, 2007).

Mivel a C, illetve az A és B izoformák 1. exonja különböző, az 5' irányban elhelyezkedő cisz szabályozóelemek is különböznek, így az egyes izoformák szövetspecifikus expressziót mutatnak. A C izoforma, vagyis a mezotripszinogén kizárólag a hasnyálmirigyben fejeződik ki, expressziós szintje azonban mind mRNS, mind fehérje szinten jóval alacsonyabb, mint a másik két pankreatikus tripszinogéné. Az alacsonyabb transzkripciós szintet pankreatikus sziget könyvtárból szekvenált EST-k aránya mutatja (Kaestner és mtsai, 2003), míg fehérje szinten — elektroforetikus elválasztás alapján — a mezotripszinogén a pankreatikus folyadék teljes tripszinogén tartalmának mindössze 3-10%-át teszi ki (Rinderknecht és mtsai, 1984; Rinderknecht és mtsai, 1979; Scheele és mtsai, 1981). A B izoforma — a korábbi feltételezésekkel szemben (Wiegand és mtsai, 1993) — nem kizárólag az agyban expresszálódik, a megfelelő transzkriptumot számos egyéb szövetből is kimutatták: RT-PCR-t követő szekvenálással prosztatá, vastagbél és légúti eredetű epiteliális sejtvonalakból, valamint vastagbél nyálkahártyából (Cottrell és mtsai, 2004), illetve számos EST-t klónoztak különböző agyterületeken kívül szívből, méhből és tumorsejt-vonalakból is (Rowen és mtsai, 2005). Az RT-PCR-rel vizsgált sejtvonalakban tripszin immunreaktivitás is kimutatható volt (Cottrell és mtsai, 2004). A B izoforma agyi eloszlását Tóth és munkatársai vizsgálták mind mRNS, mind fehérje szinten (Tóth és mtsai, 2007).



Eredményeik azt mutatják, hogy a humán tripszinogén 4 valamennyi vizsgált agyterületen expresszálódik, bár eltérő mennyiségben, valamint a valósídejű PCR, illetve az ELISA kísérletek eredményei meglehetősen jól korreláltak. Immunhisztokémiai festéssel a proteáz expresszióját neuronokban és gliasejteken, főleg asztrocitákban, lokalizálták. Az A izoforma transzkripcióját egyetlen EST szekvencia (BI823946) támasztja alá, melyet egy agyból, tüdőből és heréből származó mRNS keverékből klónoztak. A fehérje expressziójáról azonban nincs adat, bár a megfelelő génnel transzfektált HeLa sejtekből kimutatható a fehérje termelődése (Németh és mtsai, 2007).

Máig tisztázatlan, hogy a humán tripszinogén 4 szekrécióra kerül-e, illetve ha nem, miként alakul ki a diszulfidhidak által stabilizált szerkezet. Az A és B izoformák szignálszekvenciája ugyanis nem tartalmazza az eukarióta szignálpeptidekre általánosan jellemző motívumokat, vagyis az Ala-Val-Ala-Val szekvenciát követő  $\beta$ -kanyart és szignálpeptidáz hasítóhelyet (von Heijne, 1985). Bár ez a szignálszekvencia nagy arányban tartalmaz töltéssel rendelkező aminosavakat, humán agyból izolált mikroszóma és plazmamembrán frakciókon végzett membránkötési kísérletek során a C izoformával szemben mind a rekombináns módon előállított A, mind pedig a B forma erősen membránkötőnek bizonyult (Tóth, 2006). Ezzel összhangban epiteliális sejtvonalak immunfestését követően a humán tripszinogén 4 citoplazmatikus vezikulákkal mutatott kolokalizációt, a fehérje szekrécióját azonban nem sikerült kimutatni (Cottrell és mtsai, 2004). Agyi minták immunfestése során viszont az extracelluláris mátrixban is kimutattak pontszerű humán tripszin 4 festődést, ami arra utal, hogy — legalább bizonyos esetekben — a humán tripszinogén 4 szekrécióra kerülhet.

### ***1.6.3. Inhibitor rezisztencia***

A humán tripszin 4 talán legjellegzetesebb tulajdonsága a természetesen előforduló polipeptid inhibitorokkal szembeni rezisztenciája (Rinderknecht és mtsai, 1984; Nyaruhucha és mtsai, 1997; Katona és mtsai, 2002; Szmola és mtsai, 2003). Ezt az enzimet is jól gátolják a kis molekulatömegű szerin proteáz, illetve tripszin inhibitorok, mint a DFP, PMSF, illetve benzamidin, p-aminobenzamidin, TLCK, leupeptin. Ezzel szemben a kanonikus szerin proteáz inhibitorok, mint a BPTI, hPSTI, STI, holdbab inhibitor, kutya szubmandibuláris mirigy inhibitor, csirke ovomukoid,

APPI és ekotin, nem képeznek szoros komplexet a humán tripszin 4-gyel, a kötési erősség 2-7 nagyságrenddel alacsonyabb, mint más tripszinek esetén. A humán tripszin 4 a szerpin mechanizmusú  $\alpha 1$ -antitripszin ( $\alpha 1$ -AT) általi gátlásra is rezisztens (Rinderknecht és mtsai, 1984).

#### **1.6.4. Szubsztrátspecifitás**

A humán tripszin 4 más tripszinekhez hasonlóan arginin és lizin utáni peptidkötéseket hasít. Kisméretű, P' kontaktust nem tartalmazó kromogén és fluorogén szubsztrátokon az enzim katalitikus hatékonysága nem marad el más tripszinek mögött (Rinderknecht és mtsai, 1984; Medveczky és mtsai, 2003; Szmola és mtsai, 2003). Ezzel szemben a humán tripszin 4 a fehérje szubsztrátokat — a 193-as argininnel történő ütközés következtében — gyengén hasítja, bár a sebességsökkenés mértéke különféle szubsztrátok esetén eltérő lehet. A humán tripszin 4 a pankreatikus zimogéneket 500-1000-szer lassabban aktiválja, mint a humán tripszin 1 vagy 2, valamint autoaktivációra sem képes, a humán tripszin 1 Arg122-Val123 peptidkötését a humán tripszin 1-hez viszonyítva szintén mintegy 500-szor lassabban hasítja, másfelől viszont a humán tripszin 2-t csak 20-szor lassabban emésztí, mint a humán tripszin 1 (Szmola és mtsai, 2003). A humán tripszin 4 szubsztrátspecifitását részletesen egy  $\alpha 1$ -AT mutánsokból álló könyvtáron vizsgálták (Szepessy és Sahin-Tóth, 2006). Bár a humán tripszin 4 teljességgel rezisztens az  $\alpha 1$ -AT általi gátlásra, szelektíven hasítja a Lys10-Thr11 peptidkötést. A Thr11-et különféle aminosavakkal helyettesítve azt találták, hogy az enzim a P1' pozícióban a kisméretű, poláros oldallánccal rendelkező szerin és treonin aminosavakat tartalmazó peptidkötéseket szelektíven hasítja ( $k_{cat}/K_M \approx 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), a hasítási sebesség akár 100-200-szor nagyobb, mint más P1' aminosavak esetén. Ezzel összhangban a humán tripszin 4 hasította az  $\alpha 1$ -AT Pittsburgh mutánsának Arg358-Ser359 reaktív peptidkötését, és gyorsan inaktiválódott a szerpin mechanizmus által ( $k_a \approx 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Az  $\alpha 1$ -AT-en kapott eredményeket a mielin bázikus fehérjével (MBP) végzett kísérletek is megerősítik: a humán tripszin 4 szelektíven hasítja az MBP lipidkötött formájában az Arg79-Thr80, valamint az Arg97-Thr98 peptidkötéseket (Medveczky és mtsai, 2006). Ezek az eredmények tehát azt mutatják, hogy a humán tripszin 4 nem tekinthető általánosságban — valamennyi fehérje szubsztráton — defektív proteáznak, hanem igen szűk szubsztrátspecifitást mutat Arg/Lys-Ser/Thr peptidkötések iránt. Valamint az is fontos tanulsága ezeknek a kísérleteknek, hogy a

szerpin mechanizmus egy lehetséges út a humán tripszin 4 inhibitor rezisztenciája leküzdéséhez.

### ***1.6.5. Az Arg193 szerepe***

Először a humán tripszin 4 szekvenciájának más tripszinekkal való összehasonlítása alapján merült fel, hogy az enzim különleges viselkedését alapjában a — valamennyi tripszinszerű szerin proteázban konzervált — 193-as glicin arginre történt mutációja határozza meg (Nyaruhucha és mtsai, 1997). Ezt a feltételezést az enzim atomi szerkezetének elemzése is megerősítette (Katona és mtsai, 2002). Az Arg193 oldallánca nyújtott konformációban helyezkedik el egy árokban, melyet a Tyr151 és His40 oldallánca, valamint a Phe41, Trp141 és Gly142 főlác atomjai bélelnek. A Tyr151 aromás gyűrűje meggátolja az Arg193 oldallánc szabad rotációját, hozzájárulva ezáltal az Arg193 rendezett konformációjának fenntartásához. Mivel a 193-as pozíció része az S2' szubsztrátkötő zsebnek, az arginin hosszú oldallánca sztérikusan ütközik a fehérje szubsztrátokkal és inhibitorokkal. Ezen felül a guanidino csoport pozitív töltése drasztikusan megváltoztatja a töltéseloszlást az S1 zseb környezetében, ami befolyásolhatja az inhibitorok megkötődését az enzim felületén. A mutáció hatására csekély mértékben torzult az oxianion lyuk: az Arg193 C $\alpha$  pozíciója 0,4-0,8 Å-mel eltolódott. Ennek ellenére az oxianion lyuk specifikus geometriája megőrzöttnek tűnik, bár meg kell jegyezni, hogy a kristályszerkezet nem a szabad enzimről, hanem a benzamidinnel komplexált formáról készült.

Az Arg193 szerepét irányított mutagenézis vizsgálatok is megerősítették, melyek során a humán tripszin 4 193-as argininjét glicinre cserélték, illetve ebben a pozícióban a konzervált glicint tartalmazó tripszinekre (humán tripszin 1, patkány tripszin 2) arginint vittek be (Medveczky és mtsai, 2003; Szmola és mtsai, 2003). A glicin/arginin csere hatására megszűnt az inhibitor rezisztencia és helyreállt az autoaktivációs képesség, a tükörképi mutáció azonban a humán tripszin 4 jellegzetes tulajdonságainak megjelenéséhez vezetett más tripszineken is. Tehát a humán tripszin 4 inhibitor rezisztenciájáért és szűk szubsztrátspecifitásáért egyedül az Arg193 evolúciós szelekciója felelős. Ezt megerősíti az a tény is, hogy a 193-as glicin szubsztitúciója eltérő fehérjekörnyezetben is hasonló hatást vált ki. A 193-as arginint (Castro és mtsai, 2001), illetve fenilalanint (Zhang és mtsai, 1995) tartalmazó kigyóméregből izolált

trombinszerű enzimek, melyek szekvencia homológiája a tripszinnel alacsony, a humán tripszin 4-hez hasonló inhibitor rezisztenciát és szűk szubsztrátspecifitást mutatnak.

#### ***1.6.6. Inhibitorok hasítása***

A kanonikus inhibitorokkal szembeni rezisztenciával párhuzamosan a humán tripszin 4 számos inhibitort gyorsan hasít (Szmola és mtsai, 2003; Tóth, 2006; Salameh és mtsai, 2008). Más tripszinek, melyekhez szorosan kötődnek a kanonikus inhibitorok, a reaktív kötést csak rendkívül lassan hidrolizálják el (Laskowski és Kato, 1980; Bode és Huber, 1992; Radisky és Koshland, 2002). Ezzel szemben a humán tripszin 4-ről bebizonyosodott, hogy gyorsan hasítja a Kunitz típusú inhibitorok, mint pl. az STI, APPI és BPTI reaktív peptidkötését. A hidrolízis sebessége a BPTI esetében a humán tripszin 1-hez viszonyítva 350-szeres, míg a szarvasmarha tripszinhez hasonlítva 150000-szeres (Salameh és mtsai, 2008). A humán tripszin 4 BPTI-vel alkotott komplexének röntgenkristallográfiás szerkezete arra enged következtetni, hogy a 193-as glicin argininnel való szubsztitúciója a nukleofil támadás útvonalára nincs hatással (Salameh és mtsai, 2008). Ezzel szemben az enzim és a BPTI P1'-P3' aminosavai közti kedvezőtlen kölcsönhatások jelentősen befolyásolják az acilezési reakciót. A humán tripszin 4 193-as argininje és a BPTI P2' Arg17 közti szterikus és elektrosztatikus gátlás, valamint a kevesebb stabilizáló hidrogénhid következtében a távozócsoport sokkal gyorsabban disszociál az enzim felszínéről, mint más tripszinek esetében. A BPTI P' csoportjainak eltávolodása lehetővé teszi víz belépését az aktív helyre, miáltal felgyorsul a dezacilezés.

A humán tripszin 4 a Kazal típusú humán pankreatikus szekretoros tripszin inhibitor (hPSTI) is gyorsan degradálja (Szmola és mtsai, 2003). A szekretoros inhibitorok szintén a kanonikus inhibitorok közé tartoznak, ám idővel — szemben a Kunitz típusú inhibitorokkal, melyek stabil komplexet képeznek a proteázzal — irreverzibilisen disszociálnak az enzim felületéről (Laskowski és Wu, 1953). Az ilyen, ún. átmeneti inhibitorok mechanizmusa triptikus hasítások meghatározott sorát foglalja magába, melyet a reaktív hely peptidkötésének hidrolízise vezet be. Tekintve, hogy a tripszinek általában szoros komplexet képeznek az inhibitorral, a sebességhatározó lépés a reaktív hely hasítása. A humán tripszin 4 ezzel szemben a reaktív peptidkötést gyorsan elhidrolizálja, viszont a fehérje szubsztrátokon mutatott alacsony aktivitása

következtében az ezt követő inaktiváló hasítások lassan történnek, így ez a sebességhatározó lépés.

### 1.6.7. Élettani szerep

A pankreatikus humán tripszin 4 bizonyára nem játszik jelentős szerepet a táplálék fehérjéinek lebontásában a vékonybélben, tekintve, hogy a másik két tripszin izoforma jóval nagyobb mennyiségben van jelen és magasabb katalitikus aktivitást mutat. A pankreatikus humán tripszin 4 egyetlen élettani szerepének így az elfogyasztott táplálékból származó tripszin inhibitorok degradációja tűnik (Szmola és mtsai, 2003). Meg kell azonban jegyezni, hogy a humán tripszin 4 általi inhibitor degradáció csak magas — a tripszinek összkonzentrációját meghaladó — inhibitor koncentrációk mellett válik jelentőssé, mivel alacsony koncentrációk esetén az inhibitorok komplexált formában vannak jelen. A humán tripszin 4-nek a hasnyálmirigy gyulladás kialakulásában játszott lehetséges szerepe is ellentmondásos. Korábban felmerült, hogy a hasnyálmirigyben idő előtt aktiválódó inhibitor rezisztens tripszin forma pankreatitist okozhat más proenzimek szabad aktivációja révén, illetve védhet is a betegség kialakulása ellen a proteázok degradációja által (Rinderknecht és mtsai, 1984; Nyaruhucha és mtsai, 1997). Később azonban bebizonyosodott, hogy a humán tripszin 4 sem más zimogének aktivációjára, sem a proteázok degradációjára nem képes, tehát ily módon nem lehet szerepe a pankreatitisz kialakulásában (Rinderknecht és mtsai, 1984; Szilágyi és mtsai, 2001; Szmola és mtsai, 2003). Amennyiben a humán tripszin 4 a hasnyálmirigyben idő előtt aktiválna, a hPSTI degradációja pankreatitisz kialakulásához vezethetne. Ezt az elképzelést alátámasztja, hogy a — szintén a hasnyálmirigy acinus sejtjeiben termelődő — katepszin B *in vitro* körülmények között a másik két tripszin izoformával szemben preferált módon aktiválja a humán tripszin 4-et. Egy ilyen mechanizmus fiziológiás szerepének igazolásához azonban további vizsgálatok szükségesek.

Az extrapankreatikus humán tripszin 4 élettani szerepének tisztázása még várat magára, mivel nem ismert, hogy az enzim A, illetve B izoformái intracelluláris vagy szekretált fehérjék-e. Amennyiben szekretált fehérjéről van szó, egyik lehetséges funkciója lehet proteáz aktivált receptorok aktiválása. Cottrell és munkatársai eredményei szerint a humán tripszin 4 lehetséges agonistája epiteliális sejtek PAR2 és PAR4 receptorainak (Cottrell és mtsai, 2004). Később azonban ezt a megállapítást két

kutatócsoport is cáfolta, viszont leírták, hogy a humán tripszin 4 képes különböző idegi eredetű sejtek — asztrociták, illetve a retina ganglionsejtjei — membránjában jelenlévő PAR1 receptorok aktiválására (Grishina és mtsai, 2005; Wang és mtsai, 2006).

Transzgénikus egereken végzett kísérletek szerint a humán tripszinogén 4 neuronális expressziója a gliális fibrilláris savas protein (GFAP) szintjének növekedését eredményezi asztrocitákban (Minn és mtsai, 1998). A megnövekedett GFAP expresszió az asztrociták fokozott aktivációjára utal, és általában megfigyelhető Alzheimer-kórban, valamint a központi idegrendszer sérülésekre és más betegségekre adott válaszában. A transzgénikus egerek neuronjaiban  $\beta$ -amiloid rögek lerakódása is megfigyelhető volt, bár extracelluláris lerakódásokat nem tudtak kimutatni. Továbbá a transzgénikus egerek neurodegenerációra utaló jeleket sem mutattak.

A humán tripszin 4 ugyancsak szerepet játszhat egy másik neurodegeneratív betegség, a multiplex szklerózis kialakulásában. Medveczky és munkatársai kimutatták, hogy a humán tripszin 4 — szemben a humán tripszin 1-gyel és a kalpinnal — szelektíven hasítja a mielin bázikus fehérje (MBP) Arg79-Thr80 és Arg87-Thr98 peptidkötéseit (Medveczky és mtsai, 2006). Mivel a multiplex szklerózisban szenvedő betegekben található legfőbb ellenanyagok épp az MBP 85-96 peptidszekvenciáját ismerik fel, a humán tripszin 4 az immunogén szekvencia felszabadítása révén részt vehet a betegség patomechanizmusában.

A humán tripszin 4 tumorokban betöltött szerepére utaló adatok sem ellentmondásmentesek. Nyelőcső pikkelysejt karcinómájában és gyomor adenokarcinómában csökkent tripszinogén expressziót mutattak ki mRNS szinten (Yamashita és mtsai, 2003). Az expressziós szint csökkenése jól korrelált a humán tripszinogén 4 gén promóterének hipermetilációjával, ami az enzim tumorgátló szerepére utal. Ezzel szemben nem kissejtes tüdődaganatok esetén azt találták, hogy a humán tripszinogén 4 mRNS expressziós szintje nő (Diederichs és mtsai, 2004). A tripszinogének expressziós szintjével párhuzamosan a sejtek hámrétegen keresztüli migrációs képessége is nőtt, ami a humán tripszin 4 metasztatikus folyamatokban betöltött szerepére utal.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a szerin proteázok katalízisének, szubsztrátkötésének és aktivációjának összefüggéseit vizsgáltam a humán tripszin 4 példáján. Az alábbi konkrét kérdésekre kerestem a választ:

1. A humán tripszin 4 kristályszerkezete és az arginin/glicin csere tisztázta a 193-as arginin szerepét az enzim különleges tulajdonságainak meghatározásában. Nem adott azonban választ arra a kérdésre, hogy vajon a nyújtott pozícióban elhelyezkedő arginin nagy mérete által kiváltott sztérikus gátlás vagy a szubsztrátkötő helyre bevitt pozitív töltés elektrosztatikus hatása az elsődleges. Ezzel szoros összefüggésben felmerült egy állatmodell használatának lehetősége a humán tripszin 4 élettani szerepének tisztázásához. Ez az izoforma ugyanis kizárólag főemlősökben található meg, rágcsálókban csak a 193-as pozícióban tirozint tartalmazó formák ismertek. Ezért célul tűztem ki a 193-as pozícióban tirozint, valamint fenilalanint tartalmazó tripszin mutánsok előállítását és kinetikai viselkedésének összehasonlítását a 193-as glicint, illetve arginint tartalmazó formákkal különböző szubsztrátokkal és inhibitorokkal szemben.

2. Munkám célja volt továbbá a glicin/arginin csere reakciómechanizmusra gyakorolt hatásának részletes elemzése kisméretű kromogén/fluorogén szubsztrátokon. Egyrészt protonleltár méréseket végeztem, amely a hidrogénhidaknak a katalitikus ciklus során bekövetkező változásairól ad felvilágosítást, másrészt gyorskinetikai kísérletek segítségével elemi lépésekre lebontva jellemeztem a glicint, illetve arginint tartalmazó formák kinetikáját MUGB szubsztrát analógon.

3. Ugyancsak munkám célja volt a zimogén aktivációt kísérő konformációváltozás tanulmányozása. Célul tűztem ki, hogy az aktivációs domén csuklópántjai körüli flexibilitás csökkentésének hatását vizsgáljam mind a zimogén/aktív konformációs átmenetre, mind a katalitikus mechanizmusra. Ehhez az egyes csuklóglicineket alaninra cseréltem, és megvizsgáltam, hogy ez a perturbáció milyen hatással van az aktív forma aktivációs doménjének szerkezetére, illetve a katalitikus mechanizmusra.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Mutagenézis

A humán tripszin 4-et Katona és munkatársai klónozták pankreatikus cDNS könyvtárból (Katona és mtsai, 2002). A patkány tripszin 2-t Craik és munkatársai klónozták (Craik és mtsai, 1985), az enzimet zimogén formában Dr. Bódy Árpád bocsátotta rendelkezésemre. Az R193G, R193A, R193G/G19A, R193G/G142A és R193G/G184A mutánsokat tartalmazó DNS-konstrukciókat Dr. Medveczky Péter, a S195A mutánst Dr. Tóth Júlia bocsátotta rendelkezésemre. A G19A mutáció bevitelekor az 5' primer tartalmazta a kívánt mutációt, az összes többi esetben megaprimer mutagenézist alkalmaztunk. A PCR reakciók során használt templátokat és primereket (Invitrogen) az 2. táblázat tartalmazza. A PCR termékeket egy módosított pET-17b vektorba klónoztuk (Katona és mtsai, 2002). A DNS munkát standard protokollok szerint végeztük (Sambrook és Russell, 2000). Az elkészült konstrukciókat szekvenálással ellenőriztük.

Mutáns tripszin	Templát	Primerek
Humán tripszin 4 R193F	pET-17b: hu try 4 R193G	TCCTGCCAGTTTGACTCTGGTGGCCC  TAATACGACTCACTATAGGG GACTGCAGAGCT↓CCCGGGGCTTTAGC
Humán tripszin 4 R193Y	pET-17b: hu try 4 R193G	TCCTGCCAGTATGACTCTGGTGGCCC  TAATACGACTCACTATAGGG GACTGCAGAGCT↓CCCGGGGCTTTAGC
Humán tripszin 1 R193F	pET-17b: hu try 1 R193G	TCCTGCCAGTTTGACTCTGGTGGCCC  TAATACGACTCACTATAGGG GCG↓TCGACTTAGCTGTTGGCAGCTATGGTTG
Humán tripszin 1 R193Y	pET-17b: hu try 1 R193G	TCCTGCCAGTATGACTCTGGTGGCCC  TAATACGACTCACTATAGGG GCG↓TCGACTTAGCTGTTGGCAGCTATGGTTG
Patkány tripszin 2 R193F	pTRAP, pET-17c: rat try 2 G193R	TCCTGCCAGTTTGACTCTGGTGGCCC  TAATACGACTCACTATAGGG



Mutáns tripszin	Templát	Primerek TAG↓ <b>TCGACT</b> TTTATTGACATAATGACTGTAG
Patkány tripszin 2 R193Y	pTRAP, pET-17c: rat try 2 G193R	TCCTGCCAGTATGACTCTGGTGGCCC  TAATACGACTCACTATAGGG TAG↓ <b>TCGACT</b> TTTATTGACATAATGACTGTAG
Humán tripszin 4 R193G	pET-17b: hu try 4	TCCTGCCAGGGTGACTCTGGTGGCCC  TAATACGACTCACTATAGGG GACTGCAGAGCT↓CCCGGGGGCTTTAGC
Humán tripszin 4 S195A	pET-17b: hu try 4	CCTGCCAGCGTGACGCTGGTGGCCCTGTG TAATACGACTCACTATAGGG GACTGCAGAGCT↓CCCGGGGGCTTTAGC
Humán tripszin 4 R193A	pET-17b: hu try 4 R193G	TCCTGCCAGGGTGACTCCGGTGGC  TAATACGACTCACTATAGGG GACTGCAGAGCT↓CCCGGGGGCTTTAGC
Humán tripszin 4 R193G/G19A	pET-17b: hu try 4 R193G	GCTGA↓ <b>AGCTT</b> TCCCCGTGACGATGATGACA AGATTGTTGGGGCCTACACCTGTGAG GACTGCAGAGCT↓CCCGGGGGCTTTAGC
Humán tripszin 4 R193G/G142A	pET-17b: hu try 4 R193G	ATCTCCGGCTGGGCCAACACTCTGAGC  TAATACGACTCACTATAGGG GACTGCAGAGCT↓CCCGGGGGCTTTAGC
Humán tripszin 4 R193G/G184A	pET-17b: hu try 4 R193G	ATGTTCTGTGTGGCCTTCCTTGAGGGA  TAATACGACTCACTATAGGG GACTGCAGAGCT↓CCCGGGGGCTTTAGC

**2. Táblázat A mutagenézishez használt templátok és primerek.** A primerek a következő sorrendben vannak feltüntetve: megaprimer, a gén 5', illetve 3' végéhez illeszkedő primer. A mutációt hordozó tripleteket aláhúzás jelöli. A klónozáshoz használt restriktációs endonukleázok hasítóhelyét félkövér kiemelés jelöli. A humán tripszin 4 esetében a 3' primer SacI hasítóhelyet tartalmaz, a humán tripszin 1, valamint a patkány tripszin 2 esetében SalI hasítóhelyet. Az 5' primer a humán tripszin 4 R193G/G19A mutáns kivételével a pET-17b vektorban található T7 promóter szekvenciájához illeszkedett, a gének klónozását a poliklónozó helyen található HindIII hasítóhely tette lehetővé. A G19A primer HindIII hasítóhelyet tartalmazott.

### 3.2. A rekombináns tripszinogének előállítása

A rekombináns tripszinogéneket *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen) törzsében zárványtest formájában expresszáltuk, majd *in vitro* renaturáltuk Szilágyi és munkatársai módszere szerint (Szilágyi és mtsai, 2001). A  $\text{MgCl}_2/\text{CaCl}_2$  kezeléssel kompetenssé tett sejteket hősokkal (42 °C, 90 s) történő kezeléssel transzformáltuk, és LB-médiumban 37 °C-on folyamatos rázatás közben növesztettük 100 µg/ml ampicillin jelenlétében. A logaritmusos fázisban ( $\text{OD}_{600} = 0,6$ ) 1 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk a fehérjetermelést, majd további 3 órán át növesztettük a sejteket. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, és a kultúrátérfogat felének megfelelő 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0,1% Triton-X (pH 8,0) tartalmú pufferben felfuszpendáltuk. A lízist a sejtek lefagyasztását/felolvasztását követően 30 percig szobahőmérsékleten való kevertetéssel tettük teljessé. A zárványtesteket lecentrifugáltuk (10 min, 10000 rpm), majd háromszor mostuk 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA (pH 8,0) összetételű pufferrel. A fehérjét 10 mg/ml koncentrációban 30 mM ditiotritol 6 M guanidin-HCl, 100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA (pH 8,9) tartalmú pufferben 1 órán át redukáltuk 37 °C-on; a fel nem oldódott szennyeződések ultracentrifugálással távolítottuk el (45000 rpm, 30 min). A denaturált és redukált tripszinogéneket nitrogén főlévezetése mellett cseppenként 50-szeresre hígítottuk oxigénmentes redoxpufferbe (0,9 M guanidin-HCl, 100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA (pH 8,9), valamint 1 mM L-cisztein és 1 mM L-cisztin). Az oldatot egy éjszakán át 4 °C-on kevertettük; az aggregálódott fehérjét centrifugálással távolítottuk el (30 min, 25000 rpm).

### 3.3. A tripszinogén és tripszin mutánsok tisztítása

A zimogének többségét anioncserélő kromatográfiával tisztítottuk Q Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences) oszlopon 0-1 M NaCl grádienssel 20 mM HEPES pufferben (pH 7,0). A 193-as glicint tartalmazó tripszinogén formákat ezzel szemben fenil szefaróz Fast Flow kationcserélő (Amersham Biosciences) oszlopra vittük fel, hogy megakadályozzuk az autoaktivációt. Az oszlopot 20 mM Na-citráttal (pH 4,5) ekvilibráltuk, majd 0-1 M NaCl grádienssel eluáltuk a fehérjét. A tripszinogéneket sertés enterokinázzal (Sigma) aktiváltuk 1000:1 moláris arányban 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 8,0) pufferben. Az aktív tripszineket affinitás kromatográfiával tisztítottuk STI szefaróz (Sigma) oszlopon 10 mM HCl-dal eluálva.

Mind a tripszinogéneket, mind pedig a tripszineket ultraszűrőssel töményítettük Vivaspin (Vivascience) oszlopok felhasználásával, majd 2,5 mM HCl-ban alikvotokban tároltuk -80 °C-on. A fehérjepreparátumok tisztaságát és homogenitását SDS poliakrilamid gélelektroforézissel és reverz fázisú HPLC-vel ellenőriztük. A fehérjekoncentrációt a 280 nm-en mutatott fényelnyelés alapján határoztuk meg, az  $\epsilon_{280} = 41535 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  moláris extinkciós koefficiens alkalmazva.

### 3.4. Differenciális pásztázó kalorimetria

A kalorimetriás méréseket egy Microcal VP-DSC műszeren végeztük. A denaturációs görbéket 10 °C és 85 °C között 2,5 atm nyomáson vettük fel 60 °C/h fűtési sebességgel. A minták 0,4 mg/ml fehérjét tartalmaztak 20 mM Na-foszfát (pH 8,0) pufferben. A pufferrel mért alapvonalat levontuk a fehérjék denaturációs görbéjéből.

### 3.5. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

A CD-spektroszkópiai méréseket egy Jasco 720 spektropolariméteren (Japanspectroscopic) 20 °C-on végeztük. A spektrumokat 195-250, illetve 240-310 nm között 0,1 nm-es lépésekben vettük fel. A minták a közeli UV-spektrumok esetében 0,4 mg/ml fehérjét tartalmaztak, míg a távoli UV-spektrumok esetében 0,04 mg/ml fehérjét 20 mM Na-foszfátban (pH 8,0). Az alkalmazott hullámhossz-tartomány, valamint a fehérjekoncentráció függvényében a fényút hossza 0,1, illetve 1 cm volt. A spektrumok három mérés átlagát reprezentálják.

### 3.6. Limitált proteolízis

50  $\mu\text{M}$  koncentrációjú tripszinogént vagy tripszint tartalmazó mintákat 10:1 moláris arányban szarvasmarha  $\alpha$ -kimotripszin (Worthington) jelenlétében inkubáltunk 10 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot is tartalmazó 100 mM Tricin pufferben (pH 8,0) szobahőmérsékleten. Meghatározott időközönként 6  $\mu\text{l}$  mintákat vettünk, melyekben a reakciót kétszer tömény SDS mintapuffer hozzáadásával, és az ezt követő melegítéssel (95 °C, 5 min) állítottuk le. A proteolízis analízise céljából a mintákat 15%-os SDS poliakrilamid gélen futtattuk meg redukáló körülmények között. A mintákat 1 órán át Brilliant Blue G-vel festettük, majd egy éjszakán át festéktelenítettük 5% metanol, 7% ecetsav tartalmú

oldatban. Az egyes sávok intenzitását denzitometriával határoztuk meg a GeneTools (Syngene) képanalizáló szoftver segítségével. Az aktív tripszin formák esetében kimotripszin nélküli kontrollkísérleteket is végeztünk, ami lehetővé tette az autodegradáció figyelembevételét a kiértékelés során. 1 mM D-MePhe-Pro-Arg-aldehid jelenlétében is elvégeztük a kísérleteket, amely — kromogén szubsztrátokon végzett mérések szerint — 95%-nál nagyobb mértékben gátolta a különböző tripszin formákat, ezzel szemben nem volt hatással a kimotripszin aktivitására. A kimotripszin hasítóhelyét N-terminális aminosav szekvenálással határoztuk meg. A proteolitikus fragmentumokat SDS poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztottuk, egy ProBlot polivinilidén difluorid (PVDF) membránra (PE Biosystems) blottoltuk, majd Edman-lebontással meghatároztuk az N-terminális szekvenciát egy Procise 494 szekvenátoron (Applied Biosystems). Az aminosav szekvenálást Dr. Patthy András végezte.

### 3.7. Az N-terminális kémiai módosítása

Az N-terminális hozzáférhetőségét az Ile16 NaNCO által történő karbamilálásával, és ezt követő Edman lebontással határoztuk meg Camire módszere szerint (Camire, 2002). A reakcióelegyek 10  $\mu$ M fehérjét tartalmaztak 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 30 mM ammónium-bikarbonát (pH 8,0) összetételű pufferben. A reakciót 0,5 M NaNCO (Aldrich) (pH 8,0) hozzáadásával indítottuk, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat. Meghatározott időközönként mintákat vettünk, és azonos térfogatú 5 M hidroxilamin (Aldrich) (pH 8,0) hozzáadásával állítottuk le a reakciót. 100 pmol fehérjemintákat ProBlot polivinilidén difluorid membránra (PE Biosystems) blottoltunk, és 200  $\mu$ l 10% acetonnitrillel mostuk a szekvenálási reakciót zavaró reagensok eltávolítása céljából. Az N-terminális Ile16 csúcs magasságát Dr. Patthy András határozta meg egy Procise 494 szekvenátoron (Applied Biosystems). A megadott értékek három mérés átlagát reprezentálják. Kontrollkísérletek során a NaNCO-ot NaCl-dal helyettesítettük. 1 mM D-MePhe-Pro-Arg-aldehid jelenlétében is elvégeztük a kísérleteket. Ezeken túlmenően olyan kontrollkísérleteket is végeztünk, amelyek lehetővé tették a különböző tripszin minták esetében kapott eredmények összevetését egy teljes mértékben hozzáférhető N-terminálissal: ezen kísérletek során a humán tripszin 4 N-terminálisának megfelelő szintetikus hexapeptidet használtuk gyantához kötött formában. Az IVGGYT peptidet Dr. Patthy András szintetizálta Fmoc kémiával egy ABI 431A szilárdfázisú peptidszintetizátoron (Applied Biosystems). Az Fmoc

csoport eltávolításra került az N-terminális izoleucinról, ezzel szemben a C-terminális treonin kötve maradt a HMP gyantához.

### 3.8. Proflavin kötés

Az aktív konformációban jelenlévő tripszin arányát Fersht és Requena módszere szerint határoztuk meg egy BioLogic SFM300 megállított áramlások készülékben (Fersht és Requena, 1971; Fersht, 1972). A kísérletek során gyorsan összekevertük (0,25 ms holtidő) tripszin és proflavin (Sigma) egyenlő térfogatát (50-50  $\mu$ l) 20 mM Tricin pufferben (pH 8,0) 20 °C-on. A tripszin/proflavin komplex kialakulását spektrofotometriásan követtük 465 nm-en. A kísérletek során számos időgörbét átlagoltunk. Szarvasmarha tripszinogént (Sigma) felhasználó kontrollkísérletekben nem tapasztaltunk jelváltozást.

### 3.9. Enzimaktivitás mérés

A Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilid törzsoldatokat dimetilformamidban (Sigma) készítettük. A dimetilformamid végkoncentrációja a mérések során nem érte el az 1%-ot, kivéve az R193G/G142A mutáns esetében, ahol maximális koncentrációja 5% volt. A szubsztrát hidrolízisét egy Shimadzu UV-2101PC spektrofotométeren 405 nm-en követtük.

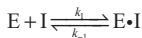
A 193-as pozícióban szubsztituált tripszinek esetében időgörbéket vettünk fel 37 °C-on 1 ml 50 mM Tricin, 0,1 M NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,005% Triton-X (pH 8,0) tartalmú pufferben. Az enzimkoncentráció 10-20 nM között változott, a szubsztrátkoncentráció 100  $\mu$ M volt. A gátlási vizsgálatok során az inhibitorok moláris feleslege 10-100000 között változott a kötéseerősségtől függően. Az időgörbéket globális illesztéssel, a DynaFit program segítségével értékeltük ki (Duggleby és Clarke, 1991; Kuzmič, 1996). A kiértékelés során az összes rendelkezésre álló görbéhez egyszerre illesztettünk. A mérési adatokhoz történő illesztésnél a Michaelis-Menten modellt alkalmaztuk:



ahol E az enzim, S a szubsztrát,  $E \cdot S$  a Michaelis komplex, P a termék.

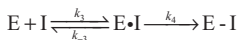
Ekkor  $k_{\text{cat}} = k_2$ ,  $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ . A gátlási vizsgálatok során az előbbi egyenlet

kiegészült a kompetitív inhibíció egyenletével:



ahol I az inhibitor.

Az aldehid inhibitor esetében a reverzibilis lépést egy irreverzibilis lépés követi:



Az inhibíciós konstansok számításánál az előzőleg meghatározott katalitikus konstansokat használtuk.

Az aktivációs domén csuklópánt glicinjeinek vizsgálatánál a reakció kezdeti sebességét mértük a szubsztrátkoncentráció függvényében. A méréseket 1 ml végtérfigatban 20 mM Tricin, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 8,0) pufferben 20 °C-on végeztük. A Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilid szubsztráton végzett vizsgálatok során az enzimkoncentráció 1,22-530 nM volt, a szubsztrátkoncentrációt hat-nyolc lépésben 6,25  $\mu\text{M}$  és 7,5 mM között változtattuk az adott tripszininforma katalitikus tulajdonságainak megfelelően. Az  $\text{N}_\alpha$ -benzoyl-DL-Arg p-nitroanilid szubsztrát esetében az enzimkoncentráció 1 nM volt, a szubsztrátkoncentráció 25  $\mu\text{M}$  és 20 mM között változott. A kiértékelés során mérési eredményeinkhez a Michaelis-Menten hiperbolát illesztettük az OriginPro 7.5 program segítségével. A megadott adatok három mérés átlagát reprezentálják. A gátlási vizsgálatokat 250  $\mu\text{M}$  Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilid szubsztrát jelenlétében 25 nM enzimen végeztük, a p-aminobenzamidin koncentrációja 20  $\mu\text{M}$  és 5 mM között változott. Adatainkhoz az alábbi egyenletet illesztettük:

$$\frac{[E]}{[E_0]} = 1 - \frac{[E_0] + [I_0] + K_I - \sqrt{([E_0] + [I_0] + K_I)^2 - 4[E_0][I_0]}}{2[E_0]}$$

### 3.10. Zimogén aktiváció vizsgálata

A humán tripszin 4 variánsok zimogén aktiváló képességét kimotripszinogénen vizsgáltuk. A 3 ml térfogatú reakcióelegyek 100 nm kimotripszinogént és 10 nm tripszint tartalmaztak 50 mM Tricin, 0,1 M NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,005% Triton-X (pH 8,0) pufferben. A reakcióelegyeket 37 °C-on inkubáltuk 30 percig, miközben 5 percenként 10  $\mu\text{l}$  térfogatú mintákat vettünk. A minták kimotripszin aktivitását egy

Shimadzu UV-2101PC spektrofotométeren 405 nm-en vizsgáltuk 37 °C-on 100  $\mu$ M Suc-Ala-Pro-Phe p-nitroanilid szubsztráton 1 ml 50 mM Tricin, 0,1 M NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,005% Triton-X (pH 8,0) pufferben.

### 3.11. Tranziens kinetika

A tranziens kinetikai méréseket egy 450 watt teljesítményű szupercsendes Hg-Xe lámpával (Hamamatsu) felszerelt KinTek SF-2004 megállított áramlásos készüléken végeztük. A fluoreszcenciát 0,5 nm-es résszélességgel 365 nm-en gerjesztettük, míg a kibocsátott fényt egy WG420 vágósűrítő segítségével (Comar Instruments) 420 nm felett detektáltuk. A fotoelektron sokszorozó feszültsége 600-800 V között változott a különböző mutánsok esetében. 40  $\mu$ l térfogatú mintákat 1:1 arányban 8 ml/s áramlási sebességgel kevertünk össze. A szubsztrát telítési kísérletek során 0,1-1  $\mu$ M enzimet 0,94-500  $\mu$ M 4-metilumbelliferil 4-guanidinobenzoát (MUGB, Sigma) szubsztrát analóggal reagáltattunk 20 mM Tricin, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  pufferben (pH 8,0) 20 °C-on. Az adatpontokat logaritmikus skálán vettük fel, így lehetővé vált, hogy a többlépéses folyamat valamennyi — nagyságrendileg eltérő időállandójú — fázisáról kiegyensúlyozottan gyűjtsünk adatpontokat (Walmsley és Bagshaw, 1989). Egy kísérlet során számos időgörbét átlagoltunk.

### 3.12. Protonleltár mérések

A protonleltár mérések során időgörbéket vettünk fel egy Shimadzu UV-2101PC spektrofotométeren 405 nm-en 150  $\mu$ M Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilid szubsztráton. A méréseket 1 ml végtérfogatban 20 mM Tris, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  pufferben 25 °C-on végeztük. A puffereket Tris-bázis (Sigma) és Tris-HCl (Sigma) ioncserélt vízbe, illetve nehézvízbe (Sigma) megfelelő arányban történő bemérésével állítottuk elő. A pH mérőről leolvasott érték a vizes puffer esetében 8,3, a nehézvízes puffer esetében 8,6 volt. A hidrogén izotópokat különböző arányban tartalmazó puffereket a két törzsoldatból térfogat alapján történő keveréssel állítottuk elő a sűrűségek figyelembevételével. Az enzimeket vizes oldatból mértük be, majd 15 percig a küvetában előtermosztáltuk. Az adatok három-négy mérés átlagát reprezentálják.

Az időgörbéket globális illesztéssel, a DynaFit program segítségével értékeltük ki (Kuzmič, 1996). A mérési adatokhoz történő illesztésnél a Michaelis-Menten modellt alkalmaztuk:



Ahol E az enzim, S a szubsztrát, P a termék.

Ekkor  $k_{cat} = k_2$ , a  $k_{cat}/K_M$  értékét pedig a következő módon számolhatjuk ki:

$$k_{cat} / K_M = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$$

A protonleltár görbékhez történő modellillesztéshez a GraFit 3.3 szoftvert használtuk (Leatherbarrow, 1992).



## 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

### 4.1. A rekombináns fehérjék expressziója és tisztítása

A mutagenézist megelőzően a SWISS-MODEL szoftver (Schwede és mtsai, 2003) által automatikusan generált szerkezeti modellek segítségével ellenőriztük, hogy az egyes mutációk a molekula szerkezetét nem torzítják, a bevitt oldalláncok más szerkezeti elemekkel nem ütköznek. Valamennyi tripszinogént *E. coli* sejtekben expresszáltuk, a vad típusú patkány tripszin 2-t natív formában a sejtek periplazmájába, míg a patkány tripszin 2 G193F és G193Y mutánsait, a humán tripszin 1 vad típusú, G193R, G193F és G193Y formáit, valamint a humán tripszin 4 vad típusú<sup>3</sup>, R193G, R193F, R193Y, R193A, R193G/G19A, R193G/G142A, R184A és S195A formáit a BL21(DE3)pLysS törzsben zárványtestek formájában termeltük, majd *in vitro* körülmények között renaturáltuk. A tripszinogéneket enterokinázzal aktiváltuk, majd affinitás kromatográfiával STI oszlopon tisztítottuk.

### 4.2. A 193-as pozícióban szubsztituált tripszinek kinetikai vizsgálata

#### 4.2.1. Aktivitás kisméretű, szintetikus szubsztráton

A vad típusú, valamint a 193-as pozícióban fenilalaninnal vagy tirozinnal szubsztituált humán tripszin 4 és 1, illetve patkány tripszin 2 aktivitását a Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilid tripeptid amid szubsztráton vizsgáltuk (3. táblázat). Az Arg193-at tartalmazó humán tripszin 4-gyel ellentétben mindkét másik tripszin a konzervált glicint tartalmazza ebben a pozícióban. Mivel a Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilid szubsztrát nem tartalmaz P' csoportokat, az S2' glicin helyettesítése nagyméretű aminosavakkal feltehetően nem befolyásolja a szubsztrátkötést, vagyis ily módon a mutációknak a szubsztrát hidrolízis kémiai lépéseire gyakorolt hatásáról nyerhetünk információt. Eredményeink azt mutatják, hogy a Gly193 nagyméretű aminosavakkal történő helyettesítése hatására kismértékben megnő mind a  $k_{cat}$ , mind a  $K_M$  értéke, így összességében a katalitikus hatékonyság ( $k_{cat}/K_M$ ) változatlan marad. Egy háromlépéses reakciómechanizmust feltételezve, melyben a reverzibilis szubsztrátkötési lépést két irreverzibilis lépés, az acilezés, illetve a dezacilezés követi, valószínűsíthetjük, hogy a

<sup>3</sup> A vad típusú humán tripszin 4 a 193-as pozícióban arginint tartalmaz, így az R193G forma mutáns. Az evolúciósan ősi és elterjedt aminosav azonban a glicin a 193-as helyen. Így méréseink során az R193G variánszt választottuk viszonyítási alapul szolgáló referencia formának.

mutációk hatására gyorsabbá válik a dezacilezés. Ugyanis  $K_M = K_S \frac{k_3}{k_2 + k_3}$  és

$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}$  (Fersht, 1985) és feltételezzük, hogy a  $K_S$  nem változik jelentősen. Így, ha

$k_3$  nő, mind a  $K_M$ , mind a  $k_{cat}$  értéke nő.

		$k_{cat} (s^{-1})$	$K_M (\mu M)$	$k_{cat}/K_M (M^{-1}s^{-1})$
<b>Humán tripszin 4</b>	<b>Vt (193R)</b>	$3,3 \times 10^2$	51	$6,5 \times 10^6$
	<b>R193F</b>	$1,9 \times 10^2$	29	$6,7 \times 10^6$
	<b>R193Y</b>	$1,5 \times 10^2$	23	$6,6 \times 10^6$
<b>Humán tripszin 1</b>	<b>Vt (193G)</b>	83	22	$3,8 \times 10^6$
	<b>G193F</b>	$1,9 \times 10^2$	42	$4,4 \times 10^6$
	<b>G193Y</b>	$1,2 \times 10^2$	35	$3,6 \times 10^6$
<b>Patkány tripszin 2</b>	<b>Vt (193G)</b>	70	9,2	$7,7 \times 10^6$
	<b>G193F</b>	$2,2 \times 10^2$	26	$8,3 \times 10^6$
	<b>G193Y</b>	$2,3 \times 10^2$	45	$5,2 \times 10^6$

**3. Táblázat A 193-as pozícióban szubsztituált tripszinek kinetikai paraméterei Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilid szubsztráton.** A méréseket 50 mM Tricin, 0,1 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,005% Triton-X (pH 8,0) pufferben 37 °C-on végeztük.

#### 4.2.2. Inhibíciós vizsgálatok

A 193-as pozícióban különböző aminosavakat tartalmazó tripszinek kinetikai viselkedését különböző inhibitorokkal szemben is jellemeztük: méréseinkhez egyrészt kisméretű, szintetikus, másrészt fehérjetermészetű inhibitorokat választottunk. A két kisméretű, szintetikus inhibitor — a Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilid szubsztráthoz hasonlóan — nem tartalmazott P' csoportokat. A benzamidin P1 analóg, amidin csoportja a szubsztrátkötő zseb alján lévő Asp189-cel képez sóhidat. A másik szintetikus inhibitor, a D-MePhe-Pro-Arg-aldehid kiterjedtebb kapcsolatot hoz létre az enzimmel, bár szintén csak P csoportokkal rendelkezik. Az aldehidek esetében a reverzibilis kötődést egy kémiai lépés követi, melynek során az inhibitor a katalitikus Ser195 hidroxil csoportjával félacetált képez (Bajusz és mtsai, 1978). Eredményeink alapján látható, hogy — bár a tripeptid aldehid mintegy három nagyságrenddel jobb inhibitor, mint a benzamidin — az inhibíciós konstans nem mutat jelentős eltérést a különböző enzimvariánsok esetében (4. táblázat). A gátlási kísérletek eredményei tehát megerősítik azt a korábbi feltételezésünket, hogy a Gly193 szubsztitúciója csak P

csoportokkal rendelkező partnerek — legyenek akár szubsztrátok, akár inhibitorok — kötődésére nincs jelentős hatással.

		$K_I$ (M)	
		BA	D-MeFPR-aldehid
Humán tripszin 4	Vt (193R)	$3,1 \times 10^{-5}$	$7,1 \times 10^{-9}$
	R193F	$4,7 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-8}$
	R193Y	$3,2 \times 10^{-5}$	$6,1 \times 10^{-9}$
Humán tripszin 1	Vt (193G)	$3,9 \times 10^{-5}$	$5,1 \times 10^{-9}$
	G193F	$6,6 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-8}$
	G193Y	$4,3 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-8}$
Patkány tripszin 2	Vt (193G)	$2,3 \times 10^{-5}$	$8,1 \times 10^{-9}$
	G193F	$4,1 \times 10^{-5}$	$2,4 \times 10^{-8}$
	G193Y	$2,9 \times 10^{-5}$	$6,4 \times 10^{-9}$

**4. Táblázat Kisméretű szintetikus inhibitorok inhibíciós konstansai a 193-as pozícióban szubsztituált tripszineken.** A méréseket 50 mM Tricin, 0,1 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,005% Triton-X (pH 8,0) pufferben 37 °C-on végeztük.

További vizsgálatainkhoz három Kunitz típusú fehérje inhibitorot választottunk: a szója tripszin inhibitor (STI), a szarvasmarha pankreatikus tripszin inhibitor (BPTI) és az Alzheimer prekursor protein inhibitor doménjét (APPI). Tekintve, hogy az inhibitorok szubsztrátként lépnek kölcsönhatásba az enzimmel, a gátlási kísérletek a természetes fehérje szubsztrátokkal való reakciót is jól modellezzik. Jól látható, hogy a két, a 193-as pozícióban glicint tartalmazó formát ezek az inhibitorok legalább három nagyságrenddel jobban gátolják, mint az arginint, fenilalanint vagy tirozint tartalmazókat (5. táblázat). Feltételezhető, hogy az inhibitor kötődését a P2' aminosavnak a nagyméretű S2' aminosavval való ütközése gátolja (a P2' aminosav az STI és a BPTI esetében arginin, az APPI-ben metionin). Eredményeinket a vad típusú humán tripszin 4 BPTI-vel alkotott komplexének kristályszerkezete is megerősíti, mely megmutatta, hogy az enzim-inhibitor komplex kialakulásához számos kisebb konformációs változásnak kell történni az enzim szerkezetében (Radisky és mtsai, 2006).

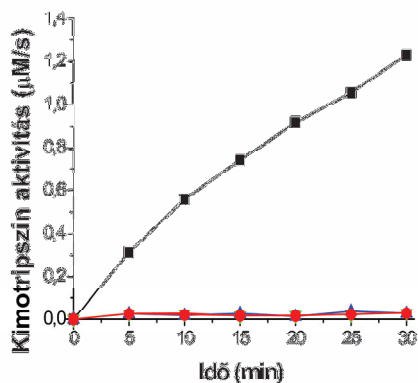
		$K_i$ (M)		
		STI	BPTI	APPI
Humán tripszin 4	Vt (193R)	$5,0 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-7}$
	R193F	$1,2 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-4}$	$5,2 \times 10^{-5}$
	R193Y	$1,9 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-4}$	$4,3 \times 10^{-5}$
Humán tripszin 1	Vt (193G)	$<10^{-10}$	$<10^{-10}$	$<10^{-10}$
	G193F	$1,2 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-5}$	$5,5 \times 10^{-5}$
	G193Y	$5,0 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-4}$
Patkány tripszin 2	Vt (193G)	$<10^{-10}$	$<10^{-10}$	$<10^{-10}$
	G193F	$3,6 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-5}$
	G193Y	$3,6 \times 10^{-6}$	$6,4 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$

**5. Táblázat Fehérjetermészetű inhibitorok inhibíciós konstansai a 193-as pozícióban szubsztituált tripszineken.** A méréseket 50 mM Tricin, 0,1 M NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,005% Triton-X (pH 8,0) pufferben 37 °C-on végeztük.

#### 4.2.3. Aktivitás fehérje szubsztráton: kimotripszinogén aktiváció

A 193-as pozícióban szubsztituált tripszinek aktivitását természetes fehérje szubsztráton is megvizsgáltuk. A pankreatikus tripszinek egyik fő funkciója — a táplálék emésztésén kívül — más pankreatikus proenzimek limitált proteolízissel történő aktivációja. A humán tripszin 4 azonban kivételt képez, mivel nem aktiválja sem a kimotripszinogént (Rinderknecht és mtsai, 1984), sem a humán tripszin 1-et és 2-t (Szilágyi és mtsai, 2001), valamint feltehetően más pankreatikus proenzimeket sem.

Megvizsgáltuk a humán tripszin 1 193-as glicinjének fenilalaninra, illetve tirozinra történő cseréjének hatását a kimotripszin aktiváció képességére limitált proteolitikus körülmények között (a tripszin és kimotripszinogén moláris aránya 1:10). Eredményeink azt mutatják, hogy a Phe193, illetve Tyr193-at tartalmazó formák — a humán tripszin 4-hez hasonlóan — nem képesek a kimotripszinogén aktivációjára (7. ábra). Ezek az eredmények a fehérjetermészetű inhibitorokon mutatott rezisztenciával összhangban arra utalnak, hogy fehérje partnerekkel történő kölcsönhatások esetében a sztérikus ütközés gátolja a partner megkötődését az enzim felületén.



7. ábra A vadttípusú humán tripszin 1 (fekete), és vadttípusú humán tripszin 4 (vörös), valamint a humán tripszin 1 R193F (kék) és R193Y (zöld) mutánsainak kimotripszinogén aktivációja. A reakcióelegyek 100 nM kimotripszinogént és 10 nM tripszint tartalmaztak 50 mM Tricin, 0,1 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,005% Triton-X (pH 8,0) pufferben. A reakcióelegyeket 37 °C-on inkubáltuk 30 percig, miközben 5 percenként 10 μl térfogatú mintákat vettünk. A minták kimotripszin aktivitását 100 μM Suc-Ala-Pro-Phe p-nitroanilid szubszt ráton 37 °C-on mértük.

#### 4.2.4. Megbeszélés

Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a 193-as pozícióban nagyméretű aminosavat tartalmazó tripszinek viselkedése igen hasonló. A szubsztitúció hatását többféle környezetben is megvizsgáltuk (humán tripszin 4 és 1, valamint patkány tripszin 2), és azt tapasztaltuk, hogy a globális szekvencia különbségek nem okoznak lényeges különbséget az egyes variánsok viselkedésében. Feltételezhető, hogy a tirozin és fenilalanin mutánsok esetében a 193-as aminosav oldalláncának konformációja is igen hasonló az argininéhez: a humán tripszin 4 Arg193 oldalláncát a Tyr151 és His40 oldalláncaival való kölcsönhatás stabilizálja (Katona és mtsai, 2002), az aromás fenilalanin és tirozin oldallancok esetében is elképzelhető egy hasonló kölcsönhatás. Eredményeink arra utalnak, hogy a humán tripszin 4 sajátos viselkedésének kialakításában elsősorban az arginin oldallánc mérete játszik szerepet. A humán tripszin 4 felszíni elektrosztatikus potenciáljának elemzése megmutatta, hogy szokatlanul nagymennyiségű pozitív töltés csoportosul az S1 zseb környezetében (Katona és mtsai, 2002), ami szerepet játszhat a partnerekhez való kötődésben, különösen Kunitz-, illetve Kazal típusú inhibitorok esetében, mivel ezek a P2 pozícióban gyakran pozitív töltésű aminosavat, arginint vagy lizint tartalmaznak. A 193-as pozíció nagyméretű, ám

töltéssel nem rendelkező aminosavakkal való szubsztitúciója azonban az Arg193-at tartalmazó formával gyakorlatilag megegyező viselkedést eredményezett.

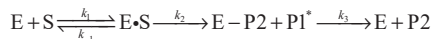
### **4.3. A vad típusú humán tripszin 4 és R193G mutánsa katalitikus ciklusának jellemzése 4-metilumbelliferil 4-guanidinobenzoát (MUGB) szubsztrát analógon**

#### **4.3.1. Előzetes ismereteink**

Egy enzimreakció mechanizmusa akkor tekinthető megoldottnak, ha az enzim valamennyi konformációs állapotát jellemeztük, és az egymásba történő átalakulásuk sebességi állandóit meghatároztuk (Fersht, 1985). Az egyensúlyi kinetikai mérések — melyek során csupán a termékek megjelenésének vagy a kiindulási anyagok fogyásának sebességét mérjük — rendszerint csak kétféle kinetikai adatot szolgáltatnak: a  $K_M$  értéket, amely esetenként megegyezik az enzim-szubsztrát komplex disszociációs állandójával, másrészt a  $k_{cat}$  értéket, amely bizonyos esetekben egy elemi sebességi állandó, más esetekben azonban számos lépés sebességi állandójából tevődik össze. Bizonyos esetekben egyensúlyi kinetikai mérésekkel is lehetséges közttermékek kimutatása vagy akár elemi sebességi állandók meghatározása — a tripszin esetében például amid és észter szubsztrát párok felhasználásával (Hedstrom és mtsai, 1992) — de ezek a módszerek nem alkalmazhatók általánosan és függenek a mechanisztikus interpretációtól. A tranziens kinetikai mérések során azonban közvetlenül megfigyeljük az intermediereket, illetve meghatározzuk keletkezésük és fogyásuk sebességét. Ily módon a tranziens kinetikai mérések közvetlen bizonyítékot szolgáltatnak a reakciómechanizmusról. Mivel a  $k_{cat}$  értékek 1 és  $10^7 \text{ s}^{-1}$  közé esnek, a méréseket az 1-től  $10^{-7}$  s-ig terjedő időskálán kell végezni. Erre alkalmasak a gyorskeveréses technikák, mint az általunk is alkalmazott megállított áramlásos módszer (Roughton, 1934; Chance, 1940).

Méréseinkhez a MUGB szubsztrát analógot választottuk, melyet elterjedten alkalmaznak tripszin és más hasonló specificitású szerin proteázok aktívhely titrálásához (Jameson és mtsai, 1973). Az észterkötést tartalmazó szubsztrát analóg fluoreszcenciája alacsony, a távozó csoport szolgáltatja a fluoreszcens jelet. A reakció tehát spektrofluorimetriánál követhető, ezáltal lehetővé téve alacsony enzim- és

szubsztrátkoncentrációk alkalmazását. Előzetes ismereteink alapján a következő mechanizmussal írhattuk le a reakciót:



**1. séma A MUGB hidrolízis mechanizmusa előzetes ismereteink alapján.** E, szabad enzim; S, szubsztrát (MUGB); E·S, Michaelis komplex; P1 és P2, első (4-metilumbelliféron) és második termék (guanidinobenzoát); a fluoreszcens speciest szíllag jelöli.

Lévn, hogy aktív hely titráló reagensről van szó, ismert volt továbbá az is, hogy az acilezés sebességi állandója sokkal nagyobb, mint a dezacilezési lépésé, és az enzim megreked az acil-enzim állapotban ( $k_2 \gg k_3 \approx 0$ ) (Bender és mtsai, 1966). Mivel a reakció utolsó lépése a sebességhatározó, egy gyors exponenciális fázist kapunk az első enzimátikus ciklus során, ami lehetővé teszi számunkra az egyes lépésekhez tartozó elemi sebességi állandók meghatározását.

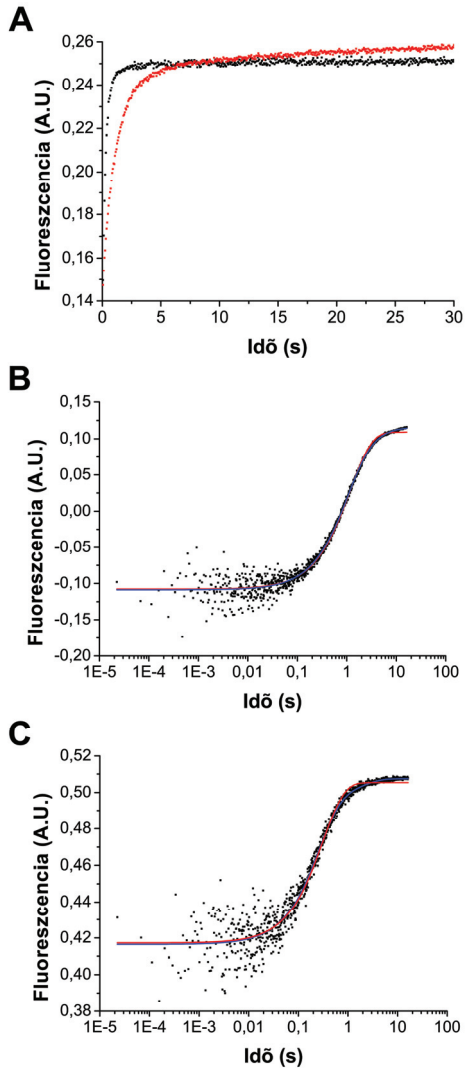
#### 4.3.2. A gyorskinetikai mérések eredményei

A vad típusú és az R193G mutáns humán tripszin 4 MUGB szubsztrát analóggal történő reakciója pszeudo-elsőrendű körülmények között egy gyors exponenciális és egy lassú lineáris fázissal írható le (8. ábra). Az exponenciális fázis egy gyors és egy lassú komponensre bontható.

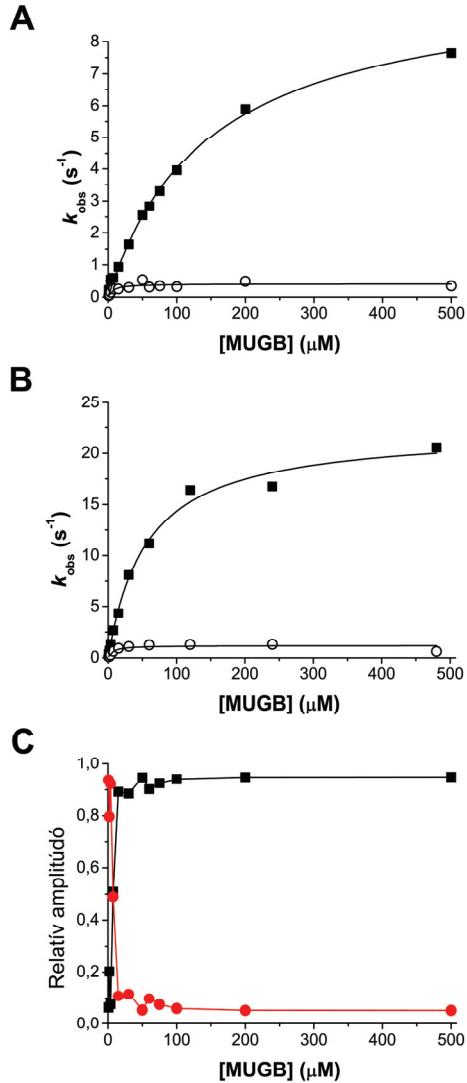
Mindkét exponenciális fázis megfigyelt sebességi állandója hiperbolikus függést mutatott a szubsztrátkoncentráció függvényében (9. ábra). A vad típusú humán tripszin 4 esetében a gyors fázis megfigyelt sebességi állandójának maximuma  $10,0 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$  értéknél volt, feltéltése megközelítőleg  $150 \text{ }\mu\text{M}$ -nál, ezzel szemben az R193G mutáns esetében a gyors fázis megfigyelt sebességi állandójának maximuma  $24 \pm 1 \text{ s}^{-1}$  értéknél volt, feltéltése  $58 \text{ }\mu\text{M}$ -nál. A gyors fázis szubsztrát telítési görbéjének kezdeti szakaszához húzott érintő meredeksége  $0,0680 \pm 0,0004 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  volt a vad típusú enzim, illetve  $0,38 \pm 0,02 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  az R193G mutáns esetében. A lassú fázis maximális értéke  $0,42 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$  volt a vad típusú enzimre, míg  $1,4 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$  az R193G mutánsra. A feltéltési értékek mindkét esetben jóval alacsonyabbak voltak a gyors fázishoz viszonyítva. A vad típusú enzim esetében a gyors fázis amplitúdója vad típusú humán tripszin 4 esetében növekvő hiperbolikus függést mutatott a szubsztrátkoncentrációtól,

míg a lassú fázisé csökkenő hiperbolikus függést. Az R193G mutáns esetében mindkét fázis amplitúdója konstans volt a vizsgált szubsztrátkoncentráció tartományban. Telítési szubsztrátkoncentrációnál azonban mindkét enzimvariáns esetében a gyors fázis dominált: a vad típusú tripszin esetében a gyors fázis teszi ki az összes jelváltozás mintegy 95%-át, az R193G mutánsra 85%-át.





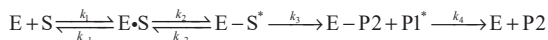
**8. ábra** Vad típusú humán tripszin 4 és R193G mutánsa időgörbéi MUGB-vel normál (A), illetve logaritmikus időskálán (B,C). 0,1  $\mu\text{M}$  vad típusú (az A panelen vörös szín jelöli, illetve B panel), illetve R193G (az A panelen fekete szín jelöli, illetve C panel) enzimet 15  $\mu\text{M}$  MUGB szubsztrát analóggal reagáltattunk 20 mM Tricin, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 8.0) pufferben 20 °C-on. A 4-metilumbelliféron termék fluoreszcenciáját 365 nm-en gerjesztettük és 420 nm felett detektáltuk. **B,C** A jobb láthatóság kedvéért a görbékbl a lineáris szakasz meredekségét levontuk. Az ábra a mérési pontokhoz illesztett egy (piros), valamint kettős (kék) exponenciális görbéket is bemutatja.



9. ábra Vad típusú humán tripszin 4 és R193G mutánsa szubsztrát telítése 0,94-500  $\mu\text{M}$  MUGB koncentráció tartományban. Az időgörbékhez kettős exponenciális és lineáris fázisokat tartalmazó görbéket illesztettünk. A gyors (■) és a lassú (○) fázis megfigyelt sebességi állandójának szubsztrátkoncentráció függése a vad típusú enzim (A) és az R193G mutáns (B) esetében, valamint a gyors (■) és a lassú (●) fázis amplitúdójának szubsztrátkoncentráció függése a vad típusú enzimre (C).

#### 4.3.3. A reakciót leíró modell

Mivel a hiperbolikus szubsztráttelítési görbe arra utal, hogy egy reverzibilis lépést egy további lépés követ, arra következtethetünk, hogy a MUGB hidrolízisét két lépésre bonthatjuk: a reverzibilis szubsztrátkötést egy reverzibilis, illetve még egy lépés követi. A fluoreszcens jel az első vagy a második reakciólépés során keletkezik, hiszen különben nem bomlana két fázisra az időgörbék exponenciális szakasza. Tehát a következő néglépéses modellt javasoltuk a reakciómechanizmus leírására:

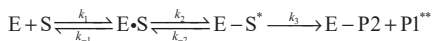


**2. séma A MUGB reakció sémája megállított áramlásos kísérleteink alapján.** E, szabad enzim; S, szubsztrát (MUGB); E·S, Michaelis komplex; E-S, kovalens enzim-szubsztrát komplex; P1 és P2, első (4-metilumbelliferon) és második termék (guanidinobenzoát); a fluoreszcens specieszeket csillag jelöli.

Hogy a felállított modell érvényességét ellenőrizzük, megvizsgáltuk, hogy a fluoreszcens szignál valóban a kovalens komplex kialakulásakor keletkezik, vagy már hamarabb, a szubsztrátkötés során. Kísérleteinket elvégeztük a S195A mutáns humán tripszin 4-en is, melyben a katalitikus szerint alaninra cseréltük, így ez az enzim képes megkötni a szubsztrátot, de nem képes hidrolízisre (Ryan és mtsai, 1976; Vajda és Náray-Szabó, 1988). Mikor a S195A mutáns enzimet reagáltattuk MUGB szubsztráttal, nem észleltünk fluoreszcencia jelváltozást, vagyis arra következtethetünk, hogy a fluoreszcens jel nem a szubsztrátkötés során keletkezik.

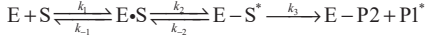
Ha a jel keletkezését megelőzi egy további lépés, azt várnánk, hogy az időgörbék kezdeti szakaszán egy lag-fázis található. Kísérleteik során azonban nem tapasztaltuk lag-fázis megjelenését. Ezt megmagyarázza az a feltételezés, hogy a teljes fluoreszcencia intenzitás igen kis hányada, mintegy 5%-a már a szubsztrátkötés hatására megjelenik, így elfedve a lag-fázist. Hipotézisünket a Berkeley Madonna szoftverrel végzett szimulációk is megerősítették.

Elvileg kétféle módon is előállhatna a két exponenciális fázis. Az első szerint a jel kialakulása megoszlik két populáció között, vagyis a 4-metilumbelliferon fluoreszcenciája az enzimről történő disszociáció hatására megnő:



Azonban abban az esetben is két fázist kapunk, ha a jel egy gyors egyensúlyi lépés során keletkezik, melyet egy lassabb irreverzibilis lépés követ ( $k_2 \gg k_3$ ). Ilyenkor

gyorsan kialakul az egyensúly — jelen esetben a kovalens enzim-szubsztrát komplex keletkezéséről van szó —, amely a gyors fázis amplitúdóját adja. A továbbiakban azonban a következő lépés mintegy elszívja a jelet szolgáltató populációt, így az újra keletkezik a kiindulási anyagokból, ami a lassú fázis amplitúdóját adja:



Ez utóbbi mechanizmus támasztja alá, hogy a szubsztrátkoncentráció növelésével a gyors fázis relatív amplitúdója nő, míg a lassú fázisé csökken, ugyanis a jel kialakulását megelőző egyensúly egyre inkább jobbra tolódik, vagyis a jel egyre nagyobb hányada keletkezik az egyensúly kialakulása során.

A két exponenciális fázis arányát telítési szubsztrátkoncentráció mellett tehát a jelet szolgáltató második lépés egyensúlyi állandója határozza meg. Így ezt az egyensúlyi állandót megadja a két fázis amplitúdójának aránya:

$$K_2 = \frac{A_{\text{gyors}}}{A_{\text{lassú}}}$$

A második reakciólépés egy elsőrendű reverzibilis reakció, így megfigyelt sebességi állandója telítési szubsztrátkoncentráció mellett a termékképződés irányába, illetve a termék visszaalakulás irányába mutató sebességi állandók összege:

$$k_{\text{obs gyors}} = k_2 + k_{-2}$$

Az egyensúlyi állandó a termékképződés irányába, illetve a termék visszaalakulás irányába mutató sebességi állandók hányadosa:

$$K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}}$$

Ebből  $k_{-2}$ -t kifejezve és az előző egyenletbe behelyettesítve megkapjuk  $k_2$ -t:

$$k_2 = k_{\text{obs gyors}} \frac{K_2}{K_2 + 1}$$

A harmadik reakciólépés termékképződés irányába mutató sebességi állandójának kiszámításakor a lépést megelőző egyensúlyt is figyelembe kell venni:

$$k_3 = k_{\text{obs lassú}} \frac{K_2}{K_2 + 1}$$

Ha a második lépés esetében az egyensúly erősen el van tolva jobbra ( $k_2 \gg k_{-2}$ ),  $K_2 \gg 1$ , így a  $\frac{K_2}{K_2 + 1}$  hányados értéke 1-hez tart. Tehát  $k_3 = k_{\text{obs lassú}}$ , vagyis az előegyensúly nem limitál. Abban az esetben azonban, ha a második lépésben az

egyensúly balra tolódik,  $\frac{K_2}{K_2 + 1} < 1$ , így nem hanyagolhatjuk el a számolás során, és

$k_3 < k_{\text{obs lassú}}$ . Ezzel ellentétben a második lépés jellemzésekor az azt megelőző egyensúlyi lépést — a szubsztrátkötést — nem kell figyelembe venni, mivel a MUGB megkötése erősen jobbra van tolva.

A harmadik reakciólépés gyakorlatilag irreverzibilis, egyrészt mivel a reakció kezdeti szakaszát vizsgáljuk, tehát a termékek mennyisége sokkal kisebb, mint a szubsztráté, másrészt az egyik termék disszociál az enzim felületéről. Így  $k_{-3} = 0$ .

A szubsztrátkötési lépés disszociációs állandóját a gyors fázis megfigyelt sebességi állandója szubsztráttelítési görbéjének kezdeti szakaszához húzott érintő meredekségéből a következő módon számolhatjuk:

$$K_d = \frac{k_2}{m_{\text{kezdeti gyors}}}$$

Az időgörbék lineáris, egyensúlyi szakaszát a lassú dezacilezés eredményezi, így a dezacilezés sebességi állandóját a lineáris fázis meredekségéből számolhatjuk. A dezacilezés sebessége a lineáris szakasz meredeksége, ezt elosztva az enzim-termék<sup>2</sup> (guanidinobenzoil tripszin) komplex koncentrációjával megkapjuk a sebességi állandót. Nagy szubsztrátfelesleg esetén gyakorlatilag az összes enzim komplexbe kerül, így annak koncentrációja megegyezik a bemérési enzimkoncentrációval. Feltételezhetjük, hogy egy reakcióciklus során annyi termék keletkezik, mint a bemérési enzimkoncentráció, mivel egyrészt az enzim felszabadulása sokkal lassabb, mint a megelőző reakciólépések, másrészt a termék visszakötődése elhanyagolható, hiszen a reakció kezdeti fázisát vizsgáljuk, így alacsony a termékkoncentráció. Így a két exponenciális fázis amplitúdójának összege megfelel a bemért enzim mennyiségének. A dezacilezés sebességi állandóját tehát a következő módon számolhatjuk ki:

$$k_4 = \frac{m_{\text{lineáris}}}{A_{\text{gyors}} + A_{\text{lassú}}}$$

#### **4.3.4. A vad típusú és az R193G mutáns humán tripszin 4 katalitikus ciklusának összehasonlítása**

Tranziens kinetikai kísérleteink célja az volt, hogy megállapítsuk, mely reakciólépéseket hogyan érinti a Gly193 argininnel való szubsztitúciója. Eredményeinket a 6. táblázat foglalja össze. A MUGB esetében a szubsztrátkötést nem

befolyásolja jelentősen a mutáció: a vad típusú enzim disszociációs állandója mindössze 2,5-szer nagyobb, mint az R193G formáé ( $K_{d \text{ vt (193R)}} = 136 \pm 1 \text{ } \mu\text{M}$ ,  $K_{d \text{ R193G}} = 54 \pm 7 \text{ } \mu\text{M}$ ), így energetikailag gyakorlatilag nincs különbség a két enzim között ( $\Delta G^\circ_{\text{vt (193R)}} = -11,9 \text{ kJmol}^{-1}$ ,  $\Delta G^\circ_{\text{R193G}} = -9,7 \text{ kJmol}^{-1}$  293 K-en). A kovalens enzim-szubsztrát komplex kialakulása mindkét enzimvariáns esetében reverzibilis folyamat. A termékképződés irányába mutató sebességi állandó a vad típusú enzimre megközelítőleg fele az R193G mutánsénak ( $k_{2 \text{ vt (193R)}} = 9,19 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{2 \text{ R193G}} = 20 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ ), míg a visszafelé mutató sebességi állandó mintegy 25%-a ( $k_{-2 \text{ vt (193R)}} = 0,81 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{-2 \text{ R193G}} = 3,56 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ ). Összességében tehát a vad típusú enzim esetében a második lépés egyensúlya nagyobb mértékben eltolódott a termékképződés irányába, mint a 193-as glicint tartalmazó referencia forma esetében ( $K_{2 \text{ vt (193R)}} = 11,4 \pm 0,7$ ,  $K_{2 \text{ R193G}} = 5,7 \pm 0,4$ ). A következő lépés közel négyszer lassabb a vad típusú enzim esetében, mint az R193G mutánsra ( $k_{3 \text{ vt (193R)}} = 0,46 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{3 \text{ R193G}} = 1,7 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$ ). Végül mindkét enzimvariáns esetében disszociál a guanidinobenzoil-tripszin komplex, azonban a vad típusú enzimben ez a lépés mintegy hatszor gyorsabban történik, mint a 193-as glicint tartalmazó forma esetében ( $k_{4 \text{ vt (193R)}} = (1,9 \pm 0,5) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{4 \text{ R193G}} = (3 \pm 3) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ).

	vt (193R)	R193G
$k_2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$9,19 \pm 0,01$	$20 \pm 1$
$k_{-2} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$0,81 \pm 0,05$	$3,56 \pm 0,01$
$k_3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$0,46 \pm 0,02$	$1,7 \pm 0,3$
$k_4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$(1,9 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	$(3 \pm 3) \times 10^{-4}$
$K_d \text{ (}\mu\text{M)}$	$136 \pm 1$	$54 \pm 7$
$K_2$	$11,4 \pm 0,7$	$5,7 \pm 0,4$

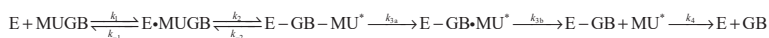
6. Táblázat A vad típusú humán tripszin 4 és R193G mutánsa elemi sebességi állandói, valamint a szubsztrátkötés disszociációs állandója és a második reakciólépés egyensúlyi állandója.

#### 4.3.5. Megbeszélés

Tranziens kinetikai méréseink alapján egy részletesebb reakciósémát állítottunk fel a korábbiakhoz képest a humán tripszin 4 MUGB hidrolízise leírására. Korábbi tanulmányokban különböző szerin proteázok MUGB-vel való reakcióját vizsgálták

egyensúlyi, illetve nem egyensúlyi kinetikai módszerekkel, és megállapították, hogy a reakcióciklus a reverzibilis szubsztrátkötésből, illetve két ezt követő irreverzibilis lépésből, az acilezésből és a dezacilezésből áll (Urano és mtsai, 1988; Payne és mtsai, 1996). Gyorskeveréses technikák alkalmazása lehetővé tette az időgörbék jobb felbontású analizisét, így felismerték, hogy az exponenciális szakasz két fázisra bontható (Ryan és mtsai, 1976; Vajda és Náray-Szabó, 1988). Ezt a jelenséget a szarvasmarha tripszin és a humán trombin esetében is leírták 4-nitrofenil 4-guanidinobenzoát szubsztrát analógon. Ez utóbbi ugyan eltérő távozó csoportot tartalmaz, reaktív csoportja megegyezik az általunk alkalmazott MUGB-vel. A jelenséget részleteiben azonban nem vizsgálták.

Eredményeink alapján a korábban „acilezés”-ként összefoglalt folyamatot két lépésre bontottuk, melyek közül az első reverzibilis, a második irreverzibilis. Mivel a MUGB kötődése katalitikusan inaktív S195A formához nem okozott fluoreszcencia jelváltozást, a két esemény a szubsztrátkötés és a dezacilezés között történhet. Így két lehetőség adódik a két lépés azonosítására: (1) az első, reverzibilis lépés az acil-enzim kialakulása, míg a második, irreverzibilis lépés a 4-metilumbelliferon disszociációja az enzim felületéről; (2) az első, reverzibilis lépés a tetraéderes átmeneti állapot kialakulása, majd ezt követi az acilezés, ami szorosan kapcsolódik a távozó csoport leválásával, így irreverzibilis lépésként jelentkezik. Mivel tripeptid szubsztrátok, melyek távozó csoportja szintén umbelliferon származék, igen jó tripszin szubsztrátok, a 4-metilumbelliferon feltehetőleg gyorsan disszociál az enzim felületéről, kizárva ezzel az első elképzelést (Kuromizu és mtsai, 1985). Eredményeink alapján tehát a következő reakciómechanizmust javasoljuk a tripszin MUGB szubsztrát analóggal történő reakciójának leírására:



**3. séma A humán tripszin 4 reakciómechanizmusa MUGB szubsztrát analógon.** A MUGB tripszin által katalizált hidrolízisének lépései a következők: szubsztrátkötés (1. lépés), az első tetraéderes átmeneti állapot kialakulása (2. lépés), a kovalens acil-enzim létrejötte (3. lépés), majd lassú dezacilezés (4. lépés). E, enzim; MUGB, 4-metilumbelliferil 4-guanidinobenzoát; GB, 4-guanidinobenzoát; MU, 4-metilumbelliferon; a fluoreszcens specieszeket csillag jelöli.

A katalitikus ciklus első lépése a MUGB reverzibilis kötődése az enzim szubsztrátkötő helyéhez ( $k_1$ ,  $k_{-1}$ ), így kialakul a fizikai Michaelis-komplex. Ezt követi a Ser195 nukleofil támadása a hasadó kötés karbonil C-atomja ellen, minek

következtében reverzibilis módon létrejön az első tetraédes átmeneti állapot ( $k_2, k_{-2}$ ). A harmadik lépés az acil-enzim (guanidinobenzoil-tripszin) és az első termék (4-metilumbelliferon) kialakulása ( $k_{3a}$ ), mely szorosan kapcsolt a fluoreszcens csoport leválásával ( $k_{3b}$ ), így irreverzibilis lépésként jelentkezik. Végül a negyedik lépés a dezacilezés ( $k_4$ ), melynek során a második termék (guanidinobenzoát) is hidrolizál az enzim felületéről, és felszabadul az enzim, mely beléphet a következő katalitikus ciklusba.

Eredményeink azt mutatják, hogy a humán tripszin 4-ben a Gly193 argininnel való helyettesítése valamennyi reakciólépést érinti, bár különböző mértékben. Legkevésbé a szubsztrátkötésre van hatással a mutáció: a  $K_d$  mindössze 2,5-szeresére nő, vagyis a szubsztrátkötés erősségét nem befolyásolja jelentősen a glicin/arginin csere. Ez az adat összhangban áll korábbi kísérleteinkkel, melyek megmutatták, hogy a 193-as pozícióban glicint tartalmazó humán tripszin 1 és humán tripszin 4 inhibíciós állandója benzamidinre — mely szintén egy hasonló szerkezetű molekula — gyakorlatilag megegyezik. Az első tetraédes átmeneti állapot kialakulása mindkét enzimen reverzibilisnek bizonyult, bár az egyensúlyi állapot eltérő: a vadtypusú enzim esetében nagyobb mértékben el volt tolódva a termékképződés irányába 20 °C-on. A tetraédes átmeneti állapot kialakulása mindkét enzimen gyorsabb volt az acilezési lépésnél. Eredményeinkkel összhangban mind specifikus oxigén és tioészter szubsztrátokkal végzett kinetikai mérések, mind kvantumkémiái számolások azt mutatják, hogy a tetraédes átmeneti állapot kialakulása reverzibilis módon történik; ezen vizsgálatok során azonban a tetraédes átmeneti állapot kialakulása volt a sebességmeghatározó lépés, amit az acil-enzim gyors keletkezése követett (Hiroara és mtsai, 1974; Ishida és Kato, 2003). Másfelől viszont szubtilizin variánsok, illetve elasztáz és  $\alpha$ -lítikus proteáz amid szubsztrát hidrolízisét vizsgálva az acil-enzim kialakulása bizonyult a sebességmeghatározó lépésnek (Hunkapiller és mtsai, 1976; Bott és mtsai, 2003).

Az általunk tapasztalt alacsony acilezési sebesség oka a használt szubsztrát analóg lehet. A guanidinobenzoil-tripszin komplex szerkezete alapján kitűnik, hogy az acil-enzim kialakulásakor a Ser195 C $\beta$  atomja jelentősen — mintegy 0,7 Å-mel — elmozdul a szubsztrátkötő zseb irányába, mivel a guanidinobenzoil csoport körülbelül 0,5 Å-mel rövidebb, mint a P1 arginin oldallánc (Mangel és mtsai, 1990). Ezt az elmozdulást a fehérje szerkezetének sok kisebb deformációja követi, aminek következtében egy nagyon stabil acil-enzim komplex alakul ki. Feltételezésünk szerint



ezek a szerkezeti változások eredményezik az alacsony acilezési rátát ( $k_3$ ), valamint az acil-enzim nagyfokú stabilitását (alacsony  $k_4$ ). Az acilezés kismértékben lassabb a vad típusú enzimén, mint az R193G mutánsén, míg a dezacilezés kissé gyorsabb. A 193-as arginint tartalmazó vad típusú humán tripszin 4 esetében a két folyamat sebessége közti kis különbség nem teszi lehetővé a MUGB-vel történő aktív hely titrálást, ellentétben a 193-as pozícióban konzervált glicint tartalmazó szerin proteázokkal.

## 4.4. A humán tripszin 1 és 4 protonleltárának összehasonlító vizsgálata

### 4.4.1. Elméleti háttér

A biológiai és biokémiai folyamatokra hatással van az oldószer prócium oxid ( $\text{H}_2\text{O}$ ) részleges vagy teljes deutérium oxiddal ( $\text{D}_2\text{O}$ ) történő helyettesítése (Alvarez és Schowen, 1987; Kresge és mtsai, 1987; Fersht, 1999; Quinn és Sutton, 1991). Ezen hatások legtöbbje közvetlenül vagy közvetett módon a biokémiai reakciók sebességében bekövetkező változásnak tulajdonítható. A sebességbeli különbségeket általánosan elfogadott módon az adott reakció könnyű- és nehézvízben mért sebességi állandójának hányadosaként ( $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$ ) fejezzük ki. Ez az arány adja meg a kinetikus oldószeres (hidrogén) izotóphatást.

A kísérletileg meghatározott kinetikus oldószeres izotóphatás mértéke információval szolgál a vizsgált reakció átmeneti állapotáról. Miután egy kémiai reakció sebességi állandóját az aktivációs szabadenergia határozza meg, az izotóphatás ( $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$ ) magában foglalja a reakció aktivációs szabadenergiájának különbségét könnyű és nehéz oldószerben.

$$k = \frac{kT}{h} e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$$

$$k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}} = e^{(\Delta G_{\text{H}}^\ddagger - \Delta G_{\text{D}}^\ddagger)/RT} = e^{\delta\Delta G^\ddagger/RT}$$

Fontos, hogy észrevegyük, hogy csak abban az esetben figyelhetünk meg izotóphatást, ha az alapállapotból az átmeneti állapotba történő átmenet során az izotópok közti szabadenergia különbség megváltozik. Mivel ez csak abban az esetben lehetséges, ha egy az izotóp atom által létesített valamely kötés megváltozik az alapállapotból az átmeneti állapotba történő átmenet során. Így tehát az izotóphatás az átmeneti állapot szerkezetéről ad felvilágosítást az izotóp atom(ok) környezetében.

A megfigyelt izotóphatás létrehozásához számos különböző jelenség járul hozzá: (1) az oldószer tulajdonságainak megváltozása (2) különbségek az oldószer és az oldott anyag közti kölcsönhatásokban (3) az O-L kötések (ahol L valamely hidrogénizotóp) nullaponti energiája közti különbség (4) a megváltozott nullaponti energia az oldott anyag (kicserélhető) H atomokkal létesített kötési esetében, amelyek az oldószerrel történő gyors kicserélődés következtében jelölődnek. Az első két jelenség a közegben bekövetkezett változásokra vezethető vissza, és transzfer, illetve szolvatációs hatásnak nevezhetjük. A két utóbbi jelenség oka kötések megváltozása magukban a reakcióba lépő molekulákban. Elsődleges hatásról beszélünk, ha a reakció során sebességmeghatározó proton (deuteron) átadás történik vagy reagáló vízmolekuláról vagy az oldott anyagról. Másodlagos hatásról beszélünk, ha a vízben vagy az oldott anyagban lévő kicserélhető hidrogén részt vesz a reakcióban, de nem adódik át a sebességmeghatározó lépés során. Mindezen jelenségek hátterében a következő okok állnak: (1) az izotóp helyettesítés hatása a reakcióba lépő molekulák H (D) atomokkal létesített kötési vibrációs frekvenciáira, valamint ezen frekvenciák megváltozására az alapállapotból az átmeneti állapotba történő átmenet során (2) az izotóp helyettesítés hatása az oldószer vízmolekulák librációs (gátolt rotációs) frekvenciáira és a frekvenciák aktivációkor bekövetkező változására.

A teljes megfigyelt kinetikus oldószeres izotóphatás az egyes hatások szorzata:

$$\left( \frac{k_{\text{H}_2\text{O}}}{k_{\text{D}_2\text{O}}} \right)_{\text{teljes}} = \left( \frac{k_{\text{H}}}{k_{\text{D}}} \right)_{\text{elsődleges}} \left( \frac{k_{\text{H}}}{k_{\text{D}}} \right)_{\text{másodlagos}} \left( \frac{k_{\text{H}_2\text{O}}}{k_{\text{D}_2\text{O}}} \right)_{\text{közeg}}$$

Az izotóphatás meghatározásához az ún. frakcionálódási faktort ( $\phi$ ) használjuk. A frakcionálódási faktor egy hányados, amely megmutatja, hogy az oldott anyag egy pontja milyen mértékben részesíti előnyben a deutériumot a próciummal szemben az oldószerhez viszonyítva. Ha a frakcionálódási faktor értéke 1-nél nagyobb, akkor a deutérium előnyben részesíti az oldott anyag adott pontját az oldószerrel szemben, vagyis fel fog ott dúsulni. Ez azt jelzi, hogy a hidrogének erősebben kötődtek az oldott anyagban, mint az oldószerben. Hasonlóan, 1-nél kisebb frakcionálódási faktor értékek azt jelzik, hogy a prócium az oldott anyag adott helyét részesíti előnyben az oldószerrel szemben, illetve, hogy az adott kötés gyengébb, mint az oldószer hidrogénnel alkotott kötési.

Az oldott anyag adott pontjára a kinetikus izotóphatást a reaktáns- és átmeneti állapotra vonatkozó frakcionálódási faktorok hányadosa adja meg:

$$k_H/k_D = \varphi^R/\varphi^T$$

Sok kicserélhető hidrogén pozíció esetén a kinetikus izotóphatást az egyes helyekre vonatkozó frakcionálódási faktorok szorzatából kaphatjuk meg:

$$\frac{k_H}{k_D} = \prod_i^{\text{reaktáns helyek}} \varphi_i^R / \prod_j^{\text{átmeneti állapot helyek}} \varphi_j^T$$

Biológiai molekulák esetében a kicserélhető helyek száma igen nagy, így szükségünk van (1) egy „listára”, amely tartalmazza valamennyi hidrogént, amely változást szenved az átmeneti állapotba történő átmenet során, vagyis amely hozzájárul az eredő izotóphatás kialakításához, és (2) valamennyi ilyen hidrogén esetében a hozzá tartozó izotóphatás mértékére. Az ilyen listákat protonleltárnak nevezzük. A protonleltár mérések könnyű- és nehézvíz különböző arányú keverékeiben történnek, és információt szolgáltatnak az átmeneti állapot során átadódó hidrogének, illetve másodlagos módon megváltozó kötések számáról.

Számos megfigyelés szerint az oldószeres izotóphatás,  $k_0/k_n$  könnyű- és nehézvíz különböző arányú keverékeiben nem változik lineárisan  $n$ -nel, D atomhányadával a keverékben (Gross és mtsai, 1936a; Gross és mtsai, 1936b; Gross és Wischin, 1936; Hornel és Butler, 1936; LaMer és Chittum, 1936; Nelson és Butler, 1938; Orr és Butler, 1937). Ennek a viselkedésnek a magyarázata abban rejlik, hogy nem minden, az izotóphatásért felelős, kicserélhető protonnak ugyanaz az izotóp-összetétele, mint az oldószernek, vagyis a frakcionálódási faktoruk nem szükségképpen egységnyi. E probléma matematikai megoldására született a Gross–Butler egyenlet, mely megadja egy adott sebesség természetű változó függését a deutérium atomhányadától oldószer elegyekben:

$$V_n = V_0 \prod_i^{\text{TS}} (1 - n + n\phi_i^T) / \prod_j^{\text{RS}} (1 - n + n\phi_j^R)$$

ahol  $V_n$  és  $V_0$  sebességek vagy sebességi állandók kétkomponensű pufferben, illetve vízben;  $n$  a deutérium atomfrakciója; RS reaktáns állapot; TS átmeneti állapot;  $\phi^R$  RS frakcionálódási faktor;  $\phi^T$  TS frakcionálódási faktor. A frakcionálódási faktor lényegében az egyensúlyi izotóphatás reciproka ( $K_D/K_H$ ) az oldószer valamint az oldott anyag alapállapota, illetőleg átmeneti állapota egy adott pontja között történő kicserélődésre. Az egyenlet legáltalánosabban alkalmazott egyszerűsítése annak a feltételezése, hogy az alapállapotbeli frakcionálódási faktor értéke NH és OH funkciós csoportokkal rendelkező katalitikus aminosavak esetén egységnyi. Így a Gross–Butler

egyenlet következő egyszerűsített formáját kapjuk:  $V_n = V_0 \prod_i^{TS} (1 - n + n\phi_i^T)$ , ami — a

$V_n/V_0$  értékét a deutérium atomhányada  $n$  függvényében ábrázolva — konkáv görbét eredményez. Ezen túlmenően feltételezhetjük, hogy a legtöbb hidrolitikus enzim esetében az aktív hely csupán egy vagy két eleme járul hozzá az izotóphatás kialakulásához, így a protonleltárt leíró görbe tovább egyszerűsödik:  $V_n = V_0(1 - n + n\phi^T)$ , illetve  $V_n = V_0(1 - n + n\phi_1^T)(1 - n + n\phi_2^T)$ . Ahogy az izotóphatásért felelős helyek száma csökken, az exponenciális görbe egyre inkább ellaposodik, míg egyetlen proton esetében lineárisává válik. Bizonyos esetekben a protonleltár görbék konkávok, ami két, ellentétes hatás egyidejű jelenlétére utal: az egyik normális izotóphatást eredményez, a másik fordítottat. Ez az inverz komponens, az ún. oldószerhatás az oldószer, illetve a fehérjeszerkezet sok pontján bekövetkező kismértékű hatás eredője, amely összességében azonban igen jelentős lehet. Az oldószer átrendeződést — az eredetétől függetlenül — egyetlen exponenciális kifejezésként vehetjük figyelembe a legegyszerűbb módon:  $V_n = V_0\phi^n$ .

#### 4.4.2. Eredmények

A protonleltár méréseket humán tripszin 1 és 4 enzimekkel Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilid szubsztráton végeztük pseudo-elsőrendű körülmények között. A protonleltár adatok kiértékeléséhez az Enyedy és munkatársa, illetve Zhang és munkatársa által kifejlesztett eljárást alkalmaztam (Enyedy és Kovach, 2004; Zhang és Kovach, 2005). A Gross—Butler egyenlet különböző egyszerűsített formáihoz a legkisebb négyzetek módszere szerinti illesztést alkalmazva megkaphatjuk  $\phi_i^T$ -t és  $\phi_i^R$ -t, vagyis az izotóphatásokat. A kiértékelés során figyelembe vettük az egyes adatpontok standard deviációját, valamint robosztus súlyozást alkalmaztunk, vagyis a többi megfigyelés hibahatárán kívül eső adatpontokat figyelmen kívül hagytuk. A humán tripszin 1 és 4 katalízisének leírására szóba jöhető modelleket a 7. táblázatban foglaltuk össze.  $V_n$  és  $V_H$  sebesség, illetve látszólagos sebességi állandó, vagyis  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_M$  vagy  $k_{obs}$  értékek is behelyettesíthetők. A humán tripszin 1 és a humán tripszin 4 különböző modellek alapján számolt frakcionálódási faktor értékeit a 8., illetve 9. táblázat mutatja be. A mechanizmus leírásához a legjobb statisztikai eredményt, illetve konzisztens frakcionálódási faktor értékeket szolgáltató modellt választottuk (10. ábra).

Modell	Egyenlet
TS <sub>1</sub>	$V_n = V_H(1 - n + n\phi_1)$
TS <sub>1</sub> , szolv.	$V_n = V_H(1 - n + n\phi_1)\phi_S^n$
2TS <sub>1</sub>	$V_n = V_H(1 - n + n\phi_1)^2$
2TS <sub>1</sub> , szolv.	$V_n = V_H(1 - n + n\phi_1)^2\phi_S^n$
TS <sub>1</sub> , TS <sub>2</sub>	$V_n = V_H(1 - n + n\phi_1)(1 - n + n\phi_2)$
TS <sub>1</sub> , TS <sub>2</sub> , szolv.	$V_n = V_H(1 - n + n\phi_1)(1 - n + n\phi_2)\phi_S^n$

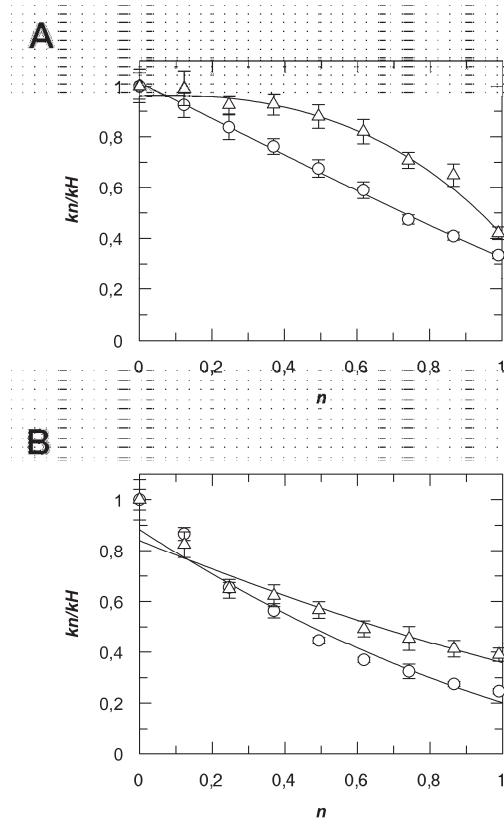
7. Táblázat A protonleltár adatokhoz történő görbeillesztésnél alkalmazott modellek.

	$\phi_1$	$\phi_2$	$\phi_S$	$\chi^2$
	$k_{cat\ n}/k_{cat\ H}$			
TS <sub>1</sub>	0,32 ± 0,01	—	(1,0)	0,3025
TS <sub>1</sub> , szolv.	0,35 ± 0,03	—	0,91 ± 0,08	0,2941
2TS <sub>1</sub>	0,56 ± 0,01	0,56 ± 0,01	(1,0)	0,473
2TS <sub>1</sub> , szolv.	<b>0,47 ± 0,03</b>	<b>0,47 ± 0,03</b>	<b>1,4 ± 0,2</b>	<b>0,2389</b>
TS <sub>1</sub> , TS <sub>2</sub>	0,6 ± 24,8	0,6 ± 24,8	(1,0)	0,5518
TS <sub>1</sub> , TS <sub>2</sub> , szolv.	0,5 ± 49,5	0,5 ± 49,5	1,4 ± 0,2	0,2867
	$(k_{cat}/K_M)_n/(k_{cat}/K_M)_H$			
TS <sub>1</sub>	0,43 ± 0,05	—	(1,0)	3,859
TS <sub>1</sub> , szolv.	<b>0,18 ± 0,02</b>	—	<b>2,4 ± 0,2</b>	<b>0,4945</b>
2TS <sub>1</sub>	0,67 ± 0,04	0,67 ± 0,04	(1,0)	5,06
2TS <sub>1</sub> , szolv.	0,31 ± 0,03	0,31 ± 0,03	4,8 ± 0,8	0,7186
TS <sub>1</sub> , TS <sub>2</sub>	0,22 ± 0,02	2,0 ± 0,2	(1,0)	0,7641
TS <sub>1</sub> , TS <sub>2</sub> , szolv.	0,3 ± 27,2	0,3 ± 27,2	4,7 ± 0,8	0,8609

8. Táblázat A humán tripszin 1 frakcionálódási faktor értékei különböző modellek alapján. A méréseket 150 μM Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilid szubsztráton 20 mM Tris, 1 mM CaCl<sub>2</sub> pufferben 25 °C-on végeztük. A puffereket Tris-bázis és Tris-HCl ioncserélt vízbe, illetve nehézvízbe megfelelő arányban történő bemérésével állítottuk elő. A pH mérőről leolvasott érték a vizes puffer esetében 8,3, a nehézvízes puffer esetében 8,6 volt. A hidrogén izotópokat különböző arányban tartalmazó puffereket a két törzsoldatból térfogat alapján történő keveréssel állítottuk elő a sűrűségek figyelembevételével.

	$\phi_1$	$\phi_2$	$\phi_3$	$\chi^2$
	$k_{\text{cat n}}/k_{\text{cat H}}$			
TS <sub>1</sub>	0,24 ± 0,05	—	(1,0)	17,46
TS <sub>1</sub> , szolv.	—	—	—	—
2TS <sub>1</sub>	<b>0,48 ± 0,03</b>	<b>0,48 ± 0,03</b>	<b>(1,0)</b>	<b>8,517</b>
2TS <sub>1</sub> , szolv.	—	—	—	—
TS <sub>1</sub> , TS <sub>2</sub>	0,5 ± 9, 4	0,5 ± 9, 4	(1,0)	9,937
TS <sub>1</sub> , TS <sub>2</sub> , szolv.	—	—	—	—
	$(k_{\text{cat}}/K_M)_n/(k_{\text{cat}}/K_M)_H$			
TS <sub>1</sub>	0,44 ± 0,05	—	(1,0)	1,832
TS <sub>1</sub> , szolv.	—	—	—	—
2TS <sub>1</sub>	<b>0,65 ± 0,03</b>	<b>0,65 ± 0,03</b>	<b>(1,0)</b>	<b>1,347</b>
2TS <sub>1</sub> , szolv.	—	—	—	—
TS <sub>1</sub> , TS <sub>2</sub>	0,7 ± 83,9	0,7 ± 83,9	(1,0)	1,572
TS <sub>1</sub> , TS <sub>2</sub> , szolv.	—	—	—	—

9. Táblázat A humán tripszin 4 frakcionálódási faktor értékei különböző modellek alapján. A méréseket 150  $\mu\text{M}$  Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilid szubsztráton 20 mM Tris, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  pufférben 25 °C-on végeztük. A puffereket Tris-bázis és Tris-HCl ioncserélt vízbe, illetve nehézvízbe megfelelő arányban történő bemérésével állítottuk elő. A pH mérőről leolvasott érték a vizes puffér esetében 8,3, a nehézvízes puffér esetében 8,6 volt. A hidrogén izotópokat különböző arányban tartalmazó puffereket a két törzsoldatból térfogat alapján történő keveréssel állítottuk elő a sűrűségek figyelembevételével.



10. ábra A humán tripszin 1 (A) és a humán tripszin 4 (B) protonleltár görbéi Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilid szubsztráton. A körök a  $k_{cat}$  értékeket jelölik, míg a háromszögek  $k_{cat}/K_M$  értékeket. A vonalak a legjobb illeszkedést adó modellt reprezentálják.

#### 4.4.3. Megbeszélés

Humán tripszin 1 és 4 esetében is amid szubsztrátanalógon mind a  $k_{cat}$ , mind pedig a  $k_{cat}/K_M$  értékek közepes izotópfüggést mutatnak ( $^{DOD}k_{cat \text{ try1}} = 3,0 \pm 0,2$ ,  $^{DOD}(k_{cat}/K_M)_{\text{try1}} = 2,4 \pm 0,2$ ,  $^{DOD}k_{cat \text{ try4}} = 4,1 \pm 0,2$ ,  $^{DOD}(k_{cat}/K_M)_{\text{try4}} = 2,6 \pm 0,3$ ), hasonlóan a szarvasmarha tripszinhez és kimotripszinhez, illetve más tripszinszerű szerin proteázokhoz, mely esetekben a kinetikus oldószeres izotóphatás értéke átlagosan 3 körüli (Bender és Hamilton, 1962; Hunkapiller és mtsai, 1976; Schowen, 1977; Alvarez és Schowen, 1987; Schowen és mtsai, 2000; Enyedy és Kovach, 2004).

A humán tripszin 1 esetében a  $k_{\text{cat}}$  izotópfüggését a két azonos proton és oldószerhatás modell írja le legjobban ( $\phi_1 = \phi_2 = 0,47 \pm 0,03$ ,  $\phi_8 = 1,4 \pm 0,2$ ). A protonok frakcionálódási faktor értékei jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal ( $\phi$  értékei 0,5-0,68 között változnak különböző tripszinszerű szerin proteázokra). Bár az esetek többségében oldószerhatást nem figyeltek meg, pl. bizonyos peptid szubsztrátanalógok  $\alpha$ -trombin által katalizált hidrolízise esetén az oldószer-átrendeződés hatása jelentős (Enyedy és Kovach, 2004). Általánosságban elmondhatjuk, hogy amid szubsztrátok esetében az acilezés a sebességmeghatározó lépés (Zerner és mtsai, 1964). Hosszabb, oligopeptid szubsztrátok esetében viszont az acilezés és dezacilezés sebessége összevethető lehet (Hedstrom és mtsai, 1992; Hedstrom, 2002). Bármelyik is a sebességmeghatározó lépés jelen esetben, a kapott modell összhangban áll a szerin proteázok katalitikus mechanizmusáról alkotott ismereteinkkel, melyek szerint a tetraédes átmeneti állapot kialakulása során két proton játssza a főszerepet. A szolvatációs tag az oxianion lyukkal kialakított hidrogénhidak következménye lehet: az átmeneti állapot létrejötte során erősebbé váló hidrogénhidak kölcsönhatások inverz izotóphatást eredményeznek. Az oxianion lyukkal alkotott hidrogénhidak lehetséges szerepe korábban már felmerült az irodalomban (Scholten és mtsai, 1988). A humán tripszin 1  $k_{\text{cat}}/K_M$  értékének izotópfüggése egy konvex görbét eredményez, melyet legjobban az egy proton és oldószerhatás modell ír le ( $\phi_1 = 0,18 \pm 0,02$ ,  $\phi_8 = 2,4 \pm 0,2$ ). Az, hogy a  $k_{\text{cat}}$  és a  $k_{\text{cat}}/K_M$  értékek izotópfüggése különböző modellekhez illeszkedik, arra utal, hogy magas, illetve alacsony szubsztrátkoncentrációk mellett más-más lépés a sebességmeghatározó. Az evolúciósan fejlett enzimek esetében alacsony szubsztrátkoncentráció mellett a reakció gyakran diffúzió kontroll közelében áll, így az izotóphatásra érzékeny kémiai lépéseket részben elfedheti a sebességmeghatározó szubsztrátkötési lépés.

A humán tripszin 4 esetében mind a  $k_{\text{cat}}$ , mind pedig a  $k_{\text{cat}}/K_M$  izotópfüggését a két proton modell írja le legmegfelelőbben (a  $k_{\text{cat}}$  esetében  $\phi_1 = \phi_2 = 0,48 \pm 0,03$ , a  $k_{\text{cat}}/K_M$  esetében  $\phi_1 = \phi_2 = 0,65 \pm 0,03$ ). Az oldószerhatás egyértelműen hiányzik, a megfelelő görbék nem is illeszthetők az adatpontokra. A  $k_{\text{cat}}$  esetében a frakcionálódási faktorokat a humán tripszin 1 értékeivel összehasonlítva teljes egyezést tapasztalunk, ami a katalitikus mechanizmus azonosságára enged következtetni. A 193-as csuklópánt glicin szubsztitúciója más aminosavakkal az acilezés sebességének csökkenését, míg a dezacilezés sebességének növekedését eredményezi mind MUGB szubsztrát analógon



(lásd korábban), mind tripeptid amid szubsztráton (Bobofchak és mtsai, 2005). Így a humán tripszin 4 esetében biztosan az acilezés a sebességhatározó lépés. Az oldószerhatás hiánya az acilezési lépés során az oxianion lyuk torzulására utal a 193-as glicin argininnel történt szubsztitúciója következtében. A tetraédes átmeneti állapottal alkotott hidrogénhidas kölcsönhatások lazulása, illetve megszűnése az oldószerhatás elmaradását eredményezheti. Az oxianion lyuk torzulását a 193-as glicin szubsztitúciója következtében több kísérleti eredmény is alátámasztja. A humán tripszin 4 röntgenkristallográfiás szerkezetében az oxianion lyuk specifikus geometriája alapvetően megőrzöttnek tűnik, bár megfigyelhető kisebb torzulás (Katona és mtsai, 2002). Mivel azonban a kristályszerkezet a benzamidinnel alkotott komplexről készült, nem nyújt betekintést az oxianion lyuk kölcsönhatásaiba. Ismert viszont a trombin G193A és G193P mutánsai H-D-Phe-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>Cl inhibitorral komplexált formájának atomi szerkezete (Bobofchak és mtsai, 2005). Ezek azt mutatják, hogy az alaninnal történő helyettesítés hatására a 193-as aminosav peptidgerinc N-jének hidrogénhidas kölcsönhatásai gyengülnek, míg a prolinnal történő szubsztitúció a kölcsönhatások teljes megszűnéséhez vezet, amit a fehérjegerinc további kisebb elmozdulása is kísér.

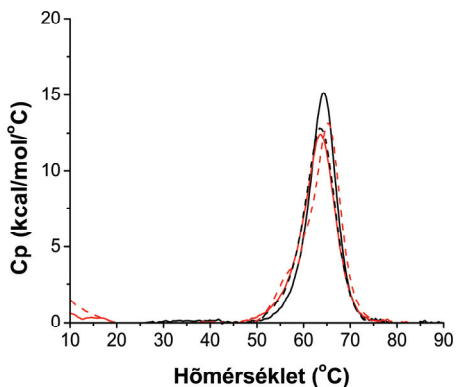
## **4.5. Az aktivációs domén csuklópánt glicinjei szerepének vizsgálata**

### **4.5.1. A mutációk kiválasztása**

Munkánk során az aktivációs domén csuklópánt glicinjeinek a zimogén/aktív átalakulásban, illetve a tripszin katalitikus mechanizmusában betöltött szerepét vizsgáltuk. Vizsgálatainkhoz a csuklópánt glicineket négy pozícióban (19, 142, 184 és 193) alaninra cseréltük irányított mutagenézissel, így csökkentve a csukló körüli flexibilitást. Egy csuklópozíciót (Gly216) nem vizsgáltunk, mivel ez — az S1 szubsztrátkötő zseb részeként — közvetlen szerepet is játszik a katalízisben. Craik és munkatársai korábban bevitték ezt a mutációt patkány tripszinbe, és azt találták, hogy az alaninnal történő helyettesítés megváltoztatja az enzim specificitását (Craik és mtsai, 1985). Választásunk azért esett az alaninnal történő szubsztitúcióra, mert így módon mindössze egyetlen metil csoportot vittünk be az enzimbe. Ezzel minimalizáltuk a szerkezet perturbációját, amit az *in silico* modellezés is megerősített (lásd korábban).

#### 4.5.2. A rekombináns fehérjék szerkezetének jellemzése

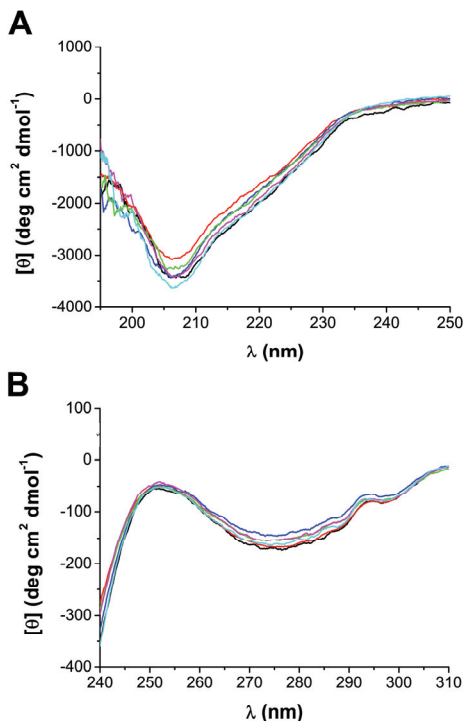
A humán tripszinogén 4 mutánsok szerkezetének stabilitását és helyes feltekeredését a vadtypusú enzimmel vetettük össze differenciális pásztázó kalorimetria és cirkuláris dikroizmus spektroszkópia segítségével. A hődenaturációs kísérletek során a vadtypusú humán tripszinogén 4 esetében egy kooperatív átmenetet figyeltünk meg, melynek látszólagos  $T_m$  értéke  $64,3\text{ }^{\circ}\text{C}$  (11. ábra). Valamennyi mutáns fehérje a vadtypushoz hasonló kooperatív denaturációs görbével és magas olvadásponttal volt jellemezhető ( $T_{m\text{ R193G}} = 63,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{m\text{ R193A}} = 64,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{m\text{ R193G/G19A}} = 63,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{m\text{ R193G/G142A}} = 63,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  és  $T_{m\text{ R193G/G184A}} = 61,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (11. ábra).



11. ábra A humán tripszin 4 zimogén (folytonos fekete vonal) és aktív (szaggatott fekete vonal) formáinak, valamint R193G/G142A mutánsa zimogén (folytonos vörös vonal) és aktív (szaggatott vörös vonal) formáinak kalorimetriás olvadásgörbéje. Az olvadásgörbéket  $2,5\text{ Atm}$  nyomáson  $60\text{ }^{\circ}\text{C/h}$  fűtési sebességgel vettük fel. A minták  $0,4\text{ mg/ml}$  fehérjét tartalmaztak  $20\text{ mM}$  Na-foszfát ( $\text{pH } 8,0$ ) pufferben.

A távoli-UV ( $195\text{--}250\text{ nm}$  tartomány) CD-spektroszkópiai mérések eredményei alapján elmondhatjuk, hogy valamennyi mutáns forma a vadtypusú humán tripszin 4-hez hasonló, rendezett másodlagos szerkezettel rendelkezik (12A ábra). A vizsgált humán tripszinogén 4 variánsok a tripszinekre általánosan jellemző, jellegzetes távoli CD-spektrumot mutattak, mely minimuma megközelítően  $206\text{ nm}$ . A tripszinek spektrumának jellegzetes alakja a magas  $\beta$ -redő tartalomnak, valamint az aromás aminosavak és diszulfidhidak nagy számának köszönhető. A mutáns tripszinogének

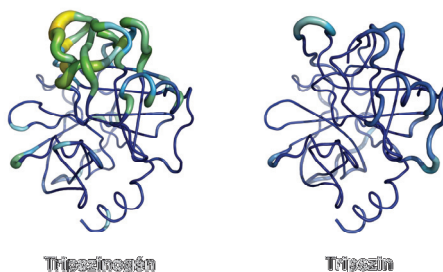
közeli UV (240-310 nm tartomány) CD-spektruma, mely az aromás aminosavak környezetének aszimmetriáját jellemzi, a vad típusú humán tripszinogén 4-hez szintén igen hasonló módon egy meglehetősen nagy negatív csúccsal jellemezhető (12B ábra). Adataink tehát azt mutatják, hogy a mutáns tripszinogének harmadlagos szerkezete is gyakorlatilag megegyezik a vad típusú humán tripszinogén 4-ével.



**12. ábra** A vad típusú humán tripszinogén 4 (vörös) és R193G (fekete), R193A (kék), R193G/G19A (zöld), R193G/G142A (rózsaszín) és R193G/G184A (türkiz) mutánsai közeli-UV (A) és távoli-UV (B) CD spektruma. A minták a közeli-UV spektrumok esetén 0,4 mg/ml, a távoli-UV spektrumok esetében 0,04 mg/ml fehérjét tartalmaztak 20 mM Na-foszfát (pH 8,0) pufferben. A méréseket 20 °C-on végeztük. A vizsgált hullámhossz tartománytól, illetve a fehérjekoncentrációtól függően a fénypút hossza 0,1 cm, illetve 1 cm volt.

#### 4.5.3. Limitált proteolízis

A humán tripszin 4 variánsai aktivációs doménjének konformációját limitált proteolízissel vizsgáltuk. Mivel a limitált proteolitikus hasítóhelyek jó korrelációt mutatnak a határozatlan elektrondenzitással, illetve a nagy krisztallográfiai hőmérsékleti faktorokkal, ez a módszer alkalmazható a fehérjék rendezetlen szegmenseinek azonosítására (Hubbard, 1998). Az aktivációs domént alkotó peptidszakaszok a tripszinogénben nem mutatnak jelentős folytonos elektrondenzitást, valamint  $200 \text{ \AA}^2$ -nél nagyobb  $B$ -faktossal jellemezhetők (Fehlhammer és mtsai, 1977; Walter és mtsai, 1982) (13. ábra). Molekuladinamikai szimulációk is azt mutatták, hogy a zimogén aktivációs doménje a molekula többi részéhez viszonyítva nagyobb mobilitással rendelkezik (Brünger és mtsai, 1987). Érdekes módon az  $\alpha 1$ -proteáz inhibitorral komplexben a tripszin érzékenysége megnő a limitált proteolitikus hasítással szemben (Kaslik és mtsai, 1995). 8-anilin-1-naftalén szulfonsav (ANS) kötési kísérletek eredményeivel alátámasztva ez azt mutatja, hogy a tripszin/szerpin komplex kialakulása során az aktivációs domén zimogénszerű szerkezetet vesz fel (Kaslik és mtsai, 1997).

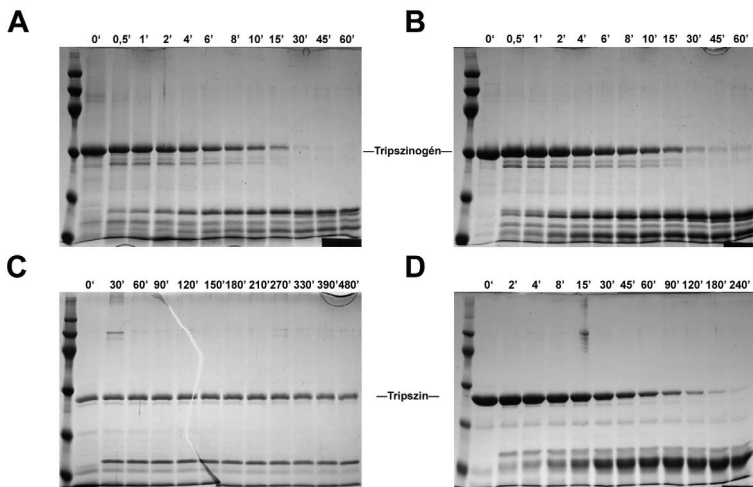


**13. ábra** A szarvasmarha tripszinogén, illetve tripszin  $B$ -faktor eloszlása. A színskálán az alacsony hőmérsékleti faktor értékeket sötétkék, míg a magas értékeket sárga szín jelöli. A tripszinogén aktivációs doménjét alkotó aminosavak jelentősen nagyobb  $B$ -faktor értékekkel rendelkeznek, mint a molekula többi része. Ezzel szemben az aktív forma valamennyi aminosava kisebb  $B$ -faktor értékekkel jellemezhető; a viszonylag nagyobb hőmérséklet faktorral rendelkező aminosavak meglehetősen egyenletesen oszlanak el a molekula felszínén. Az ábra az 1TGN és a 2BLV kristályszerkezetek, valamint a PyMol program (DeLano Scientific) felhasználásával készült (DeLano, 2002).

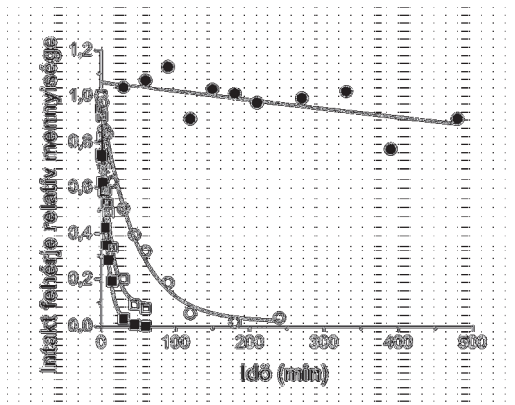
Az aktivációs domén része az autolízis hurok (Gly142-Pro152), amely a legtöbb tripszinben tartalmaz egy konzervált autolízis helyet. Ezzel szemben a humán tripszin 4 esetében az autolízis hurokban nem található lizin, viszont tartalmaz egy fenilalanint. A

különböző tripszinogén és tripszin variánsokat ezért kimotripszines limitált proteolízisnek vetettük alá. Az SDS poliakrilamid gélelektroforézis alapján elmondhatjuk, hogy mind a zimogének, mind pedig bizonyos aktív formák hasadása szelektíven, egyetlen peptidkötés mentén történik. A hasítás eredményeképpen két fragmentum keletkezik, amelyek meglehetősen ellenállóak a további hasítással szemben. N-terminális aminosav szekvenálással megerősítettük, hogy a kimotripszin által bekövetkező hasítás a Phe147-Gly148 peptidkötésnél történik.

A limitált proteolízis időbeni lefolyását a denzitometriás adatokhoz történő exponenciális görbeillesztéssel elemeztük (14. és 15. ábra). Valamennyi tripszinogén érzékeny volt a kimotripszines hasításra; sőt, a hasítás sebessége is összemérhető volt valamennyi esetben ( $k_{\text{obs}} = 0,052\text{--}0,17 \text{ min}^{-1}$ ) (10. táblázat). Az aktivált enzimek viselkedése azonban eltért egymástól (10. táblázat). A vad típusú humán tripszin 4, csakúgy, mint az R193G és az R193G/G19A mutánsok, teljesen rezisztensnek bizonyult a hasítással szemben ( $k_{\text{obs}} < 0,001 \text{ min}^{-1}$ ). Az R193A mutáns csekély mértékben hasítható volt kimotripszinnel ( $k_{\text{obs}} = 0,003 \text{ min}^{-1}$ ). Az R193G/G142A és az R193G/G184A variánsok nagyfokú érzékenységet mutattak a proteolitikus hasítással szemben: a megfigyelt sebességi állandók értéke  $0,022 \text{ min}^{-1}$ , illetőleg  $0,011 \text{ min}^{-1}$ . Eredményeink tehát azt mutatják, hogy az aktivációs domén csuklópontjaiban található glicinek helyettesítése nyomán az aktív forma aktivációs doménje is rendezetlenné válik. Ez alátámasztja azt az elképzelést, hogy a csuklópontok körüli flexibilitás gátlása zimogénszerű állapotot eredményez az aktív enzim esetében is.



14. ábra A humán tripszin 4 R193G (A,C) és R193G/G142 (B,D) mutánsai zimogén és aktív formáinak limitált proteolízise SDS poliakrilamid gélelektroforézissel követve. A különböző formák limitált proteolízisét szarvasmarha  $\alpha$ -kimo tripszinnel végeztük 10:1 moláris arány mellett 100 mM Tricin, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 8,0) pufferben szobahőmérsékleten. A molekulatömeg marker sávjai 94, 67, 43, 30, 20,1 és 14,4 kDa molekulatömegnél találhatók.



15. ábra A humán tripszin 4 R193G zimogén (■) és aktív (●) formája, valamint az R193G/G142A zimogén (□) és aktív (○) formája limitált kimo triptikus proteolízisének időfüggése. A Brilliant Blue G-vel festett géleket denzitometria segítségével értékeltük ki. Az így nyert adatpontokhoz exponenciális függvényt illesztettünk.

A teljességgel rezisztens R193G és a proteolízisre legérzékenyebb R193G/G142A formák esetében a kísérleteket elvégeztük 1 mM D-MePhe-Pro-Arg-

aldehid, egy tetraéderes átmeneti állapot analóg, jelenlétében is. Ilyen körülmények között megszűnt a két mutáns viselkedése közti különbség: R193G/G142A forma is gyakorlatilag rezisztenssé vált a hasítással szemben ( $k_{\text{obs R193G}} < 0,001 \text{ min}^{-1}$ ,  $k_{\text{obs R193G/G142A}} = 0,0018 \pm 0,0006 \text{ min}^{-1}$ ).

	$k_{\text{obs}} (\text{min}^{-1})$	
	Tripszinogén	Tripszin
<b>vt (193R)</b>	$0,16 \pm 0,01$	$< 0,001$
<b>R193G</b>	$0,12 \pm 0,02$	$< 0,001$
<b>R193A</b>	$0,17 \pm 0,01$	$0,0017 \pm 0,0003$
<b>R193G/G19A</b>	$0,14 \pm 0,01$	$< 0,001$
<b>R193G/G142A</b>	$0,087 \pm 0,006$	$0,022 \pm 0,002$
<b>R193G/G184A</b>	$0,052 \pm 0,005$	$0,011 \pm 0,002$

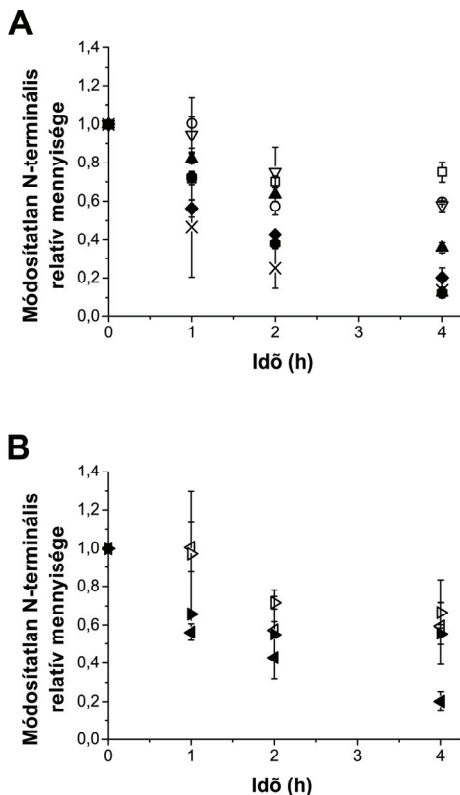
10. Táblázat A kimotriptikus hasítás megfigyelt sebességi állandói a vad típusú és különböző mutáns humán tripszin 4 zimogén, illetve aktív formák esetében.

#### 4.5.4. Az N-terminális kémiai módosítása

A zimogénszerű konformációt az N-terminális Ile16 és az Asp184 közötti sóhid meggyengülése jellemzi, így az N-terminális primer amin, amely nem illeszkedik stabilan az aktivációs zsebbe, könnyebben hozzáférhető kémiai módosítás számára. Tehát a különböző humán tripszin 4 formákat NaNCO-tal reagáltattuk, amely preferenciálisan fehérjék N-terminálisát módosítja (Stark és mtsai, 1960; Plapp és mtsai, 1971). A karbamiláció sebességét a szabad N-terminális eltűnésének Edman-lebontással való követésével határoztuk meg. A módosítás ugyanis blokkolja a fehérje N-terminálisát, így idővel csökken a szekvenálás során kapott jel. Nagyobb karbamilációs sebesség a sóhid destabilizált voltára utal. Mindhárom, a 193-as pozícióban különböző aminosavat tartalmazó variáns N-terminálisa lassan karbamilálódott: 4 óra elteltével az Ile16 75%, 59%, illetve 58%-a módosulatlan formában volt jelen (16A ábra). Ezzel szemben az egyéb csuklópozíciókat érintő mutációk esetében a karbamiláció sebessége megnőtt: az R193G/G184A mutáns esetében 36%, az R193G/G19A esetében 20%, az R193G/G142A mutáns esetében mindössze 12% volt a módosulatlan N-terminális aránya 4 óra után (16A ábra). A humán tripszin 4 N-terminálisának megfelelő IVGGYT peptidet gyantához kapcsolt formában használtuk kontrollként egy teljes mértékben

hozzáférhető N-terminális karbamilációs sebességének meghatározására. Ez esetben az Ile16 14% volt módosulatlan formában 4 óra elteltével, tehát az R193G/G19A és R193G/G142A mutánsok esetében kapott karbamilációs sebesség összevethető a szabad N-termináliséval (16A ábra). Eredményeink alapján leszögezhetjük, hogy — a 193-as hely kivételével — a csuklópozícióban lévő glicinek helyettesítése az N-terminális nagymértékű hozzáférhetőségéhez vezet. Ezen mutánsok konformációja tehát aktív állapotban is zimogénszerű.





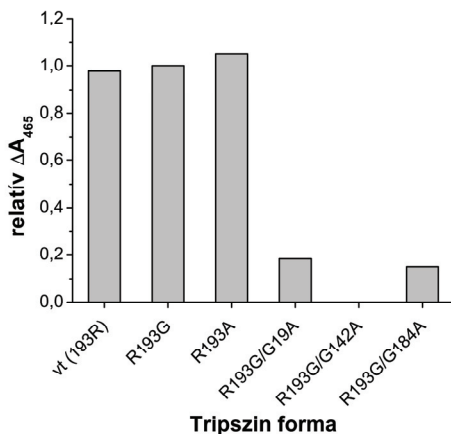
16. ábra A humán tripszin 4 variánsok N-terminálisának kémiai módosítása NaHCO<sub>3</sub>-tal. A reakcióelegyek 10  $\mu$ M tripszint tartalmaztak 30 mM ammónium-bikarbonát, 10 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 8,0) összetételű pufferben. A mintákat 0,5 M NaHCO<sub>3</sub>-tal reagáltattuk szobahőmérsékleten, majd meghatározott időközönként alikvotokat vettünk, melyekben 5 M hidroxilamin (pH 8,0) hozzáadásával állítottuk le a reakciót. Az N-terminális Ile16 szignál csökkenését aminosav szekvenálással követtük. (A) A szekvenálható N-terminális relatív mennyisége 0, 1, 2 és 4 óra után a vad típusú humán tripszin 4 (□), valamint az R193G (○), R193A (▽), R193G/G19A (◆), R193G/G142A (●) és R193G/G184A (▲) mutánsok esetében. Az IVGGYT peptidet (×) egy szabad N-terminális reprezentáló kontrollként használtuk. (B) A szubsztrát analóg D-MePhe-Pro-Arg-aldehid kötés hatása a karbamiláció sebességére: a szabad N-terminális arányának időbeni változása az R19G mutáns szabad (<) és inhibitor kötött (>) formája, illetve az R193G/G19A szabad (<●) és inhibitor kötött (>●) formája esetében.

A limitált proteolízis eredményeihez hasonlóan az N-terminális kémiai módosíthatóságában tapasztalt különbségek is megszűntek 1 mM D-MePhe-Pro-Arg-aldehid szubsztrát analóg jelenlétében (16B ábra). Míg az inhibitor kötés nem befolyásolta számottevően az R193G forma N-terminálisának hozzáférhetőségét (66%

maradt módosítatlan formában 4 óra után), az R193G/G19A mutáns esetében jelentősen csökkent a N-terminális hozzáférhetősége (56% intakt N-terminális 4 óra után).

#### 4.5.5. Proflavin kötés

A limitált proteolízis, illetve a kémiai módosítás eredményei arra utaltak, hogy a mutáns enzimek aktív formája is zimogénszerű konformációban található. Az aktív és az inaktív, zimogénszerű formák pontos arányát pH 8,0-on proflavin kötéssel határoztuk meg gyorskinetikai módszerrel (Fersht és Requena, 1971; Fersht, 1972). A tripszin/proflavin komplex kialakulását spektrofotometriásan követtük. A proflavin egy akridin festék, amely reverzibilisen kötődik a tripszin és más szerin proteázok aktív helyéhez, ami jelentős abszorpciós spektrum változásokat eredményez (Bernhard és Gutfreund, 1965; Conti és mtsai, 1998). A proflavin alkalmas az aktív hely integritásának közvetlen vizsgálatára, mivel kizárólag az aktív konformáció S1 kötőzsebéhez kötődik, míg nem kötődik a zimogén formához, ahol az S1 zseb rendezetlen szerkezetű.



17. ábra A humán tripszin 4 és mutáns formái proflavin kötése. A 465 nm-en mért abszorbancia növekedés az R193G formával összevetve. 40  $\mu$ M enzimet gyorsan kevertünk 100  $\mu$ M proflavinnal 20 mM Tricin pufferben (pH 8,0) 20 °C-on egy megállított áramlós készülékben.

A humán tripszin 4 variánsainak feleslegben adott proflavinnal való gyors keverését követően egy  $\geq 1000 \text{ s}^{-1}$  sebességi állandóval jellemezhető abszorbancia növekedést tapasztaltunk. Az egyes formák esetében kapott abszorbancia változás amplitúdóját az R193G mutánsra kapott értékkel vetettük össze (17. ábra), mivel ebben az esetben — más, valamennyi csuklópozícióban glicint tartalmazó tripszinekhez hasonlóan — feltételezhetően az enzim molekulák több, mint 99%-a az aktív konformációban van (Huber és Bode, 1978; Hedstrom és mtsai, 1996). A vad típusú enzim, valamint az R193A mutáns az R193G formához hasonló mértékű abszorbancia változást mutatott (az R193G formával összehasonlítva 98%, illetve 105%). Ezen eredmények arra utalnak, hogy a 193-as pozícióban különböző aminosavat tartalmazó variánsok mindegyike 100%-ban az aktív konformációban van jelen. Ezzel ellentétben a többi mutáns esetében az abszorbancia változás mértéke jelentősen csökkent. Az R193G/G19A és R193G/G184A formák esetében a megfigyelt amplitúdó az R193G referenciaértéknek mindössze 18%, illetve 15%-a volt. A legdrasztikusabb hatást az R193G/G142A szubsztitúció okozta, mivel ezen mutáns esetében semmilyen abszorbancia változás nem volt megfigyelhető. Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a mutáns tripszinekben az aktív hely szerkezete szubsztrátkötésre nem alkalmas, rendezetlen állapotban található.

#### ***4.5.6. Egyensúlyi aktivitás***

A glicin csuklópontok körüli konformációs flexibilitás csökkentésének az enzimkatalízisben betöltött szerepét először egyensúlyi kinetikai mérésekkel vizsgáltuk. Kísérleteinkhez egy jó amid szubsztrátot, a Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilidet használtuk, eredményeinket a 11. táblázat foglalja össze.

	$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (μM)	$k_{\text{cat}}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Relatív $k_{\text{cat}}/K_M$
vt (193R)	88 ± 3	30 ± 3	(3,0 ± 0,3) × 10 <sup>6</sup>	1,1
R193G	54 ± 1	20 ± 2	(2,7 ± 0,2) × 10 <sup>6</sup>	1
R193A	84 ± 2	27 ± 2	(3,1 ± 0,3) × 10 <sup>6</sup>	1,2
R193G/G19A	52 ± 1	79 ± 2	(6,5 ± 0,2) × 10 <sup>5</sup>	0,25
R193G/G142A	≥ 3,9 ± 0,8	≥ (1,4 ± 0,4) × 10 <sup>4</sup>	(2,7 ± 0,9) × 10 <sup>2</sup>	1,0 × 10 <sup>-4</sup>
R193G/G184A	29,2 ± 0,4	(3,5 ± 0,1) × 10 <sup>2</sup>	(8,4 ± 0,3) × 10 <sup>4</sup>	3,2 × 10 <sup>-2</sup>

**11. Táblázat A humán tripszin 4 és mutánsai egyensúlyi kinetikai paramétereit.** 1,22-530 nM enzim szubsztrát telítését határoztuk meg Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilid szubsztráton 20 mM Tricin, 10 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 8,0) pufferben 20 °C-on. A relatív  $k_{\text{cat}}/K_M$  értékek meghatározásakor az adott forma  $k_{\text{cat}}/K_M$  értékét az R193G mutánséhoz viszonyítottuk.

A 193-as glicin szubsztitúciója nagyobb méretű oldallánccal rendelkező aminosavakkal — mint amilyen az alanin vagy az arginin — nem befolyásolja számottevő mértékben a katalitikus hatékonyságot (1,2-, illetve 1,1-szeresre nő), miután mind a  $k_{\text{cat}}$ , mind a  $K_M$  értéke mintegy 1,5-szeresre nőtt az R193A és a vad típusú enzimek esetében az R193G formához viszonyítva. A többi variáns azonban másféle viselkedést mutatott: ezeknél a katalitikus hatékonyság csökkent — elsősorban a megnövekedett  $K_M$  hatására. Az R193G/G19A mutáns katalitikus konstansa gyakorlatilag megegyezett az R193G tripszinével, a  $K_M$  csökkenése következtében azonban a katalitikus hatékonyság negyed részre csökkent. Az R193G/G184A mutáns esetében a  $k_{\text{cat}}$  kb. felére csökkent, míg a  $K_M$  17-szeresre nőtt, így a  $k_{\text{cat}}/K_M$  összességében az R193G variáns katalitikus hatékonyságának mintegy harmincad részére csökkent. A legdrasztikusabb hatást az R193G/G142A mutáns esetében kaptuk, ahol a  $k_{\text{cat}}$  kevésbé, valamivel nagyobb mértékben, mint tized részre csökkent, ezzel egyidejűleg azonban a  $K_M$  értéke mintegy 700-szorosra nőtt, így a katalitikus hatékonyság négy nagyságrenddel csökkent az R193G tripszinhez viszonyítva.

Kiválasztott enzimvariánsokkal további egyensúlyi kinetikai méréseket is végeztünk. Ezekhez a valamennyi csuklópontban glicint tartalmazó R193G variánst, valamint a más pozíciókban szubsztituált tripszinek közül a tripeptid szubsztráton legnagyobb aktivitást mutató R193G/G19A mutánst választottuk. Méréseinket egy a tripeptid szubsztráttal analóg, de csak P1 aminosavat tartalmazó szubsztráton (N<sub>α</sub>-benzoi-DL-Arg p-nitroanilid), illetve egy szintén P1 analóg inhibitorral (p-aminobenzamidin) végeztük. A rövid szubsztráton kapott eredményeket a tripeptiddel összevetve láthatjuk, hogy mindkét enzim aktivitása jelentősen csökkent: a  $k_{\text{cat}}$  két, míg a  $k_{\text{cat}}/K_M$  értéke három nagyságrenddel lett alacsonyabb (12. táblázat). Továbbra is

fennáll azonban, hogy a Gly19 alaninnal történő szubsztitúciója a  $k_{\text{cat}}$  értékére nem gyakorol hatást, csupán a  $K_M$  nő mintegy tízszeresére. Az R193G/G19A mutánsnak az R193G formához viszonyított katalitikus hatékonyságát a két szubsztráton összevetve azt tapasztaljuk, hogy a  $k_{\text{cat}}/K_M$  három nagyságrendnyi változása mellett is a relatív  $k_{\text{cat}}/K_M$  alig változik, mindössze harmadára csökken. Igen hasonlóak az eredmények a P1 inhibitor esetében is: az R193G/G19A  $K_I$  értéke az R193G mutánsénak 0,3 része, ami gyakorlatilag megegyezik a tripeptid szubsztráton kapott relatív katalitikus hatékonysággal (12. táblázat).

		193G	193G/G19A
BAPNA	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$0,91 \pm 0,07$	$\geq 0,83 \pm 0,02$
	$K_M (\mu\text{M})$	$(8 \pm 2) \times 10^2$	$\geq (8,6 \pm 0,4) \times 10^3$
	$k_{\text{cat}}/K_M (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^3$	$97 \pm 5$
	Relatív $k_{\text{cat}}/K_M$	1	0,086
PABA	$K_I (\mu\text{M})$	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^2$	$66 \pm 2$
	Relatív $K_I$	1	0,30

**12. Táblázat** A humán tripszin 4 R193G, valamint R193G/G19A mutánsainak kinetikai konstansai BAPNA szubsztráton és PABA inhibitorral szemben. A méréseket 20 mM Tricin, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 8,0) pufferben 20 °C-on végeztük. Az  $N\alpha$ -benzoyl-DL-Arg p-nitroanilid szubsztrát esetében az enzimm koncentráció 1 nM volt, a szubsztrátkoncentráció 25  $\mu\text{M}$  és 20 mM között változott. A gátlási vizsgálatokat 250  $\mu\text{M}$  Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilid szubsztrát jelenlétében 25 nM enzimen végeztük, a p-aminobenzamidin koncentrációja 20  $\mu\text{M}$  és 5 mM között változott.

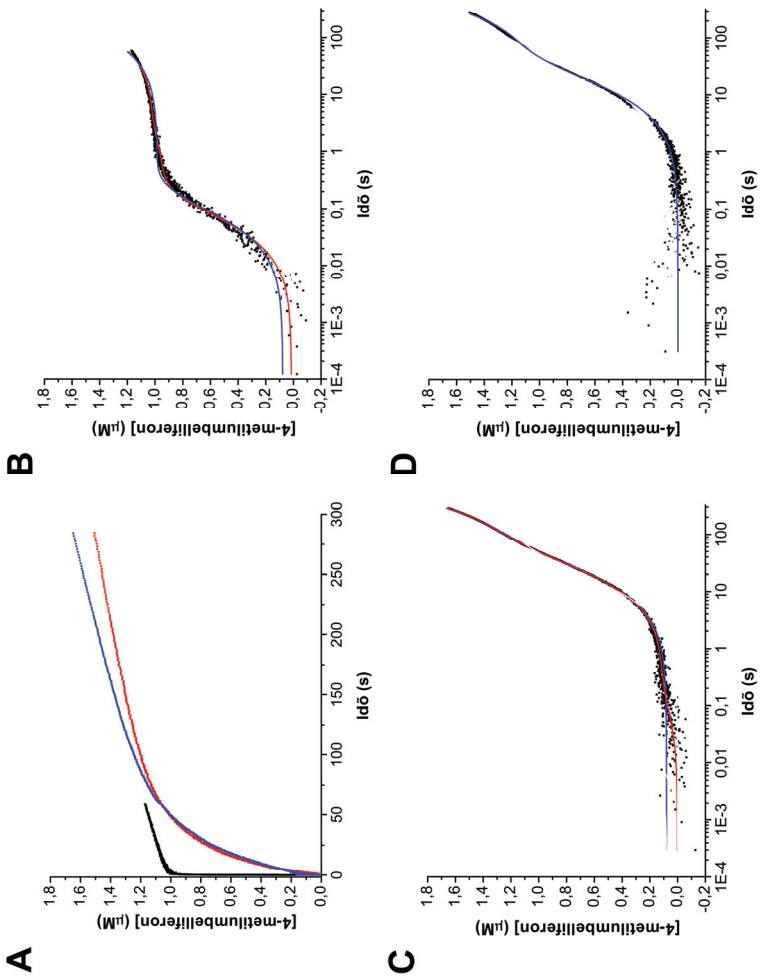
#### 4.5.7. Tranzienk kinetika

A mutáns tripszinek reakciómechanizmusának behatóbb megértése céljából tranziens kinetikai méréseket is végeztünk. Kísérleteinkhez a MUGB szubsztrát analógot választottuk, mivel a korábban kidolgozott módszer lehetővé teszi a szubsztrát hidrolízis elemi lépéseinek elkülönítését és sebességi állandójuk meghatározását. A szerkezeti és egyensúlyi kinetikai adatok alapján feltételeztük, hogy a bevitt mutációk nem változtatják meg alapvetően a reakciómechanizmust, azonban figyelembe kell venni az inaktív, zimogénszerű és az aktív, tripszinszerű konformáció között fennálló egyensúlyt:

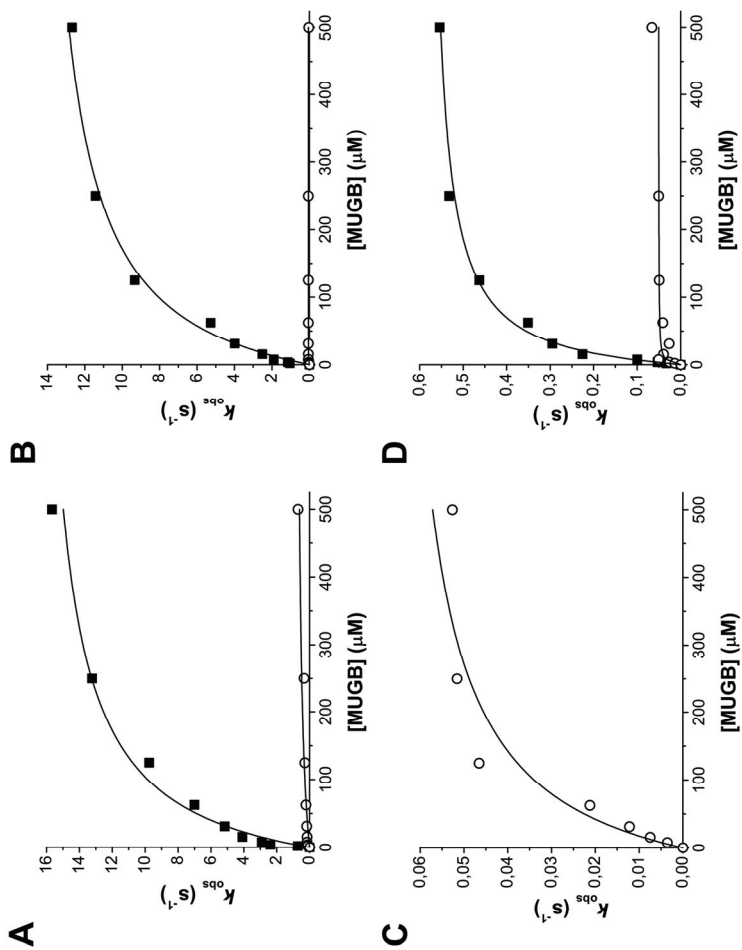


**4. séma A MUGB hidrolízis kibővített mechanizmusa.** A MUGB tripszin által katalizált hidrolízisének lépései a következők: szubsztrátkötés (1. lépés), az első tetraédes átmeneti állapot kialakulása (2. lépés), a kovalens acil-enzim létrejötte (3. lépés), majd lassú dezacilezés (4. lépés). Ezt a reakciómechanizmust bővítettük ki az inaktív zimogénszerű és az aktív forma között fennálló konformációs egyensúly figyelembevételével. Z, zimogénszerű konformáció; E, aktív konformáció; MUGB, 4-metilumbelliferil 4-guanidinobenzoát; GB, 4-guanidinobenzoát; MU, 4-metilumbelliferon; a fluoreszcens specieszeket csillag jelöli.

Az enzímreakció időbeni lefutása 20 °C-on, pszeudo-elsőrendű körülmények között egy gyors exponenciális, valamint egy lassú lineáris fázisra volt bontható — a vadtípusú humán tripszin 4-hez és R193G mutánsához hasonlóan — valamennyi tripszinforma esetében (18. ábra). Az R193A, R193G/G19A és R193G/G184A mutánsok esetében az exponenciális komponens kétfázisú volt a teljes vizsgált MUGB tartományban (1,95-500 μM), jöllehet az időgörbék kétfázisú volta elsősorban nagyobb szubsztrátkoncentrációk esetén volt szembetűnő. Az R193G/G142A mutáns viselkedését azonban az egyfázisú illesztés megfelelően leírta, így ebben az esetben egyfázisú exponenciális függvényeket illesztettünk az időgörbékhez. A továbbiakban a megfigyelt sebességi állandó szubsztráttelítési görbéit elemeztük (19. ábra).



18. ábra A humán tripszin 4 R193A (A panel fekete szín, illetve B panel), R193G/G19A (A panel vörös szín, illetve C panel) és R193G/G142A (A panel kék szín, illetve D panel) mutánsainak reakciója MUGB-vel lineáris (A) és logaritmikus időskálán (B-D).  $1 \mu\text{M}$  enzimet  $500 \mu\text{M}$  MUGB-vel reagáltattunk  $20 \text{ mM}$  Tricin,  $10 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$  ( $\text{pH } 8,0$ ) pufferben  $20^\circ\text{C}$ -on. A 4-metilumbelliferon termék fluoreszcenciáját  $365 \text{ nm}$ -en gerjesztettük és  $420 \text{ nm}$  felett detektáltuk. Az időgörbékhez egy (vörös vonal), illetve kettős (kék vonal) exponenciális és lineáris fázisokat tartalmazó görbékét illesztettünk. Az R193G/G142A mutáns viselkedését megfelelő módon leírta az egy exponenciális görbe. Az R193A és R193G/G19A mutánsok időgörbéit azonban csak egy kettős exponenciális görbe jellemzi megfelelő módon.



19. ábra A MUGB hidrolízis gyors (■) és lassú (○) fázisainak szubsztráttelítési görbéi a humán tripszin 4 R193A (A), R193G/G19A (B), R193G/G142A (C) és R193G/G184A mutánsai esetén.



Az R193A mutáns esetén mindkét exponenciális fázis sebességi állandója ( $k_{\text{obs gyors}} = 17 \text{ s}^{-1}$  és  $k_{\text{obs lassú}} = 0,28 \text{ s}^{-1}$ ) összevethető volt a vad típusú és az R193G enzimvariánsokra kapott értékekkel, jelezve, hogy a reakciómechanizmus megegyezik a másik két 193-as pozícióban különböző aminosavakat tartalmazó formáival (13. táblázat). A többi három mutáns kinetikai viselkedése azonban eltérő volt; a korábban felállított reakcióséma alapján nem lehetett ellentmondásmentesen megmagyarázni (13. táblázat). Míg a gyors fázis megfigyelt sebességi állandója az R193G/G19A mutáns esetében alig volt kisebb ( $k_{\text{obs gyors}} = 15 \text{ s}^{-1}$ ), mint az R193G referenciaformáé, az R193G/G184A mutáns esetében két nagyságrenddel csökkent ( $k_{\text{obs gyors}} = 0,59 \text{ s}^{-1}$ ). Ezen két mutáns lassú fázisának megfigyelt sebességi állandója, valamint az R193G/G142A exponenciális fázisának megfigyelt sebességi állandója gyakorlatilag megegyezik ( $k_{\text{obs lassú R193G/G19A}} = 4,7 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{\text{obs lassú R193G/G184A}} = 5,1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  és  $k_{\text{obs R193G/G142A}} = 6,9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), de két nagyságrenddel kisebb, mint az R193G humán tripszin 4 esetében. Ezen túlmenően az R193G/G19A és R193G/G184A mutánsok szubsztrát hidrolízise során a lassú fázis megfigyelt sebességi állandójának szubsztrátkoncentrációtól való függése már rendkívül alacsony MUGB koncentráció tartományban megszűnt (a féltelítési koncentrációk  $1,1 \mu\text{M}$ , illetve  $4 \mu\text{M}$ ), arra utalva, hogy a szubsztrátkötéstől független, azt megelőző folyamatot ír le.

Korábban megmutattuk, hogy a fluoreszcens jel az első tetraédes átmeneti állapot kialakulása során keletkezik, ami az időgörbék gyors fázisának megjelenését eredményezi. A zimogénszerű mutánsok esetében azonban csak az aktív konformációban található enzim molekulák képesek belépni a katalitikus ciklusba és kialakítani az első tetraédes átmeneti állapotot, vagyis a gyors fázis az aktív, tripszinszerű hányadnak felel meg. A zimogénszerű variánsok esetében a lassú fázis eredetét megmagyarázó legegyszerűbb modell szerint — a szerkezeti próbák és az egyensúlyi kinetikai mérések eredményeivel összhangban — a lassú fázist a zimogén/aktív átalakulás eredményezi. Ugyanis az aktív konformációban lévő enzim molekulák általi szubsztrátkötés a szabad tripszinszerű molekulák koncentrációját csökkenti, eltávolítva ezáltal az inaktív/aktív egyensúlyt az aktív forma irányába. A két fázis amplitúdójának aránya telítési szubsztrátkoncentrációnál tehát az aktív és inaktív konformációban lévő tripszin molekulák arányával kell, hogy megegyezzen. A transziens kinetikai mérések szerint az R193G/G19A tripszin mintegy 10%-a található aktív konformációban, összhangban a proflavin kötés során kapott 18%-kal. Az R193G/G142A mutáns esetében — mely aktív helye a proflavin kötés alapján

szubsztrátkötésre képtelen, inaktív konformációban található — gyors fázis nem volt megfigyelhető, ami szintén azt mutatja, hogy az aktív, tripszinszerű forma hányada elhanyagolható. A R193G/G184A mutáns esetében a gyors fázis amplitúdója mintegy kétszerese a lassú fázisénak, ez esetben azonban az amplitúdó adatok kevésbé megbízhatók, mivel a két fázis sebességi állandója összevethető.

Mivel az inaktív/aktív átalakulás nagyon lassú, a zimogénszerű mutánsok esetében ez válik a reakcióciklus sebességmeghatározó lépésévé. Így — a 193-as variánsokkal ellentétben — az acil-enzim kialakulása nem különíthető el más reakciólépésektől.

	$k_{\text{obs gyors}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{obs lassú}} (\text{s}^{-1})$	$k_4 (\text{s}^{-1})$
<b>vt (193R)</b>	10	0,42	$1,9 \times 10^{-3}$
<b>R193G</b>	24	1,4	$3,3 \times 10^{-4}$
<b>R193A</b>	17	0,28	$1,3 \times 10^{-3}$
<b>R193G/G19A</b>	15	$4,7 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-3}$
<b>R193G/G142A</b>	—	$6,9 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^{-3}$
<b>R193G/G184A</b>	0,59	$5,1 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-3}$

**13. Táblázat A humán tripszin 4 variánsainak kinetikai paraméterei MUGB szubsztrát analógon.** A két exponenciális fázis megfigyelt sebességi állandója, valamint a dezacilezés sebességi állandója. A megállított áramlós kísérletek során 1  $\mu\text{M}$  tripszint reagáltattunk — enzimvariánstól függően — 1,95-500  $\mu\text{M}$  MUGB-vel 20 mM Tricin, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 8,0) pufferben 20 °C-on. A felszabaduló 4-metilumbelliféron fluoreszcenciáját 365 nm-en gerjesztettük és 420 nm felett detektáltuk. A látszólagos sebességi állandók meghatározásához az időgörbékre kettős exponenciális és lineáris komponenseket tartalmazó függvényt illesztettünk. A dezacilezés sebességi állandóját a korábban leírt módon határoztuk meg.

#### 4.5.7. Megbeszélés

Az aktivációs domén glicin csuklópontjai erősen konzerváltak valamennyi szerin proteázban, ami arra utal, hogy fontos szerepet töltenek be a térszerkezet kialakításában. A csuklópánt glicinek enzimműködésben játszott szerepét támasztja alá az a tény is, hogy ezen glicinek bármelyikének szubsztitúciója a véralvadási kaszkád szerin proteáz faktoraiban — mint a FVII, FIX és FX — vérzékenység kialakulásához vezet (Giannelli és mtsai, 1994; Bernardi és mtsai, 1996; Wulff és Herrmann, 2000; Uprichard és Perry, 2002). Korábban csak fenotípusos adatok voltak ismertek ezen mutációkkal kapcsolatban, munkánk azonban a betegségek molekuláris mechanizmusába is

betekintést nyújt. Molekula dinamikai szimulációk alapján Brünger és munkatársai előrevetítették, hogy a tripszinogén aktivációjában kulcsszerepet betöltő aminosavak cseréje — mint pl. az N-terminális Ile16 vagy a csuklópánt glicinek — kiterjedt változást okoznak a fehérjeszerkezetben (Brünger és mtsai, 1987). Az Ile16 és Asp194 közötti sóhíd, valamint az Ile16 hidrofób kölcsönhatásainak hozzájárulását a zimogén/aktív átalakulás folyamatához Hedstrom és munkatársai behatóan tanulmányozták (Hedstrom és mtsai, 1996; Pasternak és mtsai, 1998). Ezzel szemben a csuklópánt glicineknek az aktív szerkezet és kialakításában és a katalitikus mechanizmusban betöltött szerepét korábban még nem tanulmányozták.

A csuklópánt glicinek helyettesítéséhez az alanint választottuk, hogy a natív szerkezet kialakulását a lehető legkisebb mértékben akadályozzuk. CD spektroszkópiai és hőstabilitás mérések alapján — várakozásainknak megfelelően — egyik mutáció sem okozott jelentős változást a humán tripszin 4 másodlagos, illetve harmadlagos szerkezetében. Ezzel szemben a mutációk hatással voltak az aktivált forma aktivációs doménjének szerkezetére. Különböző szerkezeti próbákkal sorra vizsgáltuk a zimogén és az aktív forma közti különbségeket — az autolízis hurok flexibilitását, az N-terminális hozzáférhetőségét és az aktív hely konformációját —, és azt tapasztaltuk, hogy a mutáns tripszinek zimogénszerű szerkezettel rendelkeznek. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy ezen változás mértéke a különböző formák esetében igen eltérő volt (14. táblázat).

	Rendezett szerkezetű autolízis hurok	Eltemetett N-terminális	Funkcionális aktív hely	Katalitikus aktivitás
	limitált proteolízis 10. táblázat	kémiai módosítás 16. ábra	proflavin kötés 17. ábra	Z-GPR p-NA 11. táblázat
vt (193R)	100	88	100	100
R193G	100	83	100	100
R193A	90	85	100	100
R193G/G19A	100	51	18	25
R193G/G142A	75	50	<1	<1
R193G/G184A	79	73	15	3

**14. Táblázat Az aktív konformáció %-os aránya különböző kísérleti megközelítések alapján a humán tripszin 4 aktivált formáiban.** A limitált proteolízis esetében az aktivált forma hasításának megfigyelt sebességi állandóját osztottuk a zimogén formához tartozó értékkel. Az N-terminális kémiai módosítása esetén exponenciális illesztéssel határoztuk meg a látszólagos sebességi állandókat, majd az adott aktivált formához tartozó sebességi állandót osztottuk az IVGGYT kontrol peptidhez tartozó értékkel.

A 193-as pozíció bizonyult legellenállóbbnak a perturbációval szemben: mind az arginint tartalmazó vad típusú enzim, mind az R193A mutáns — az R193G referencia variánshoz hasonlóan — az aktív formára jellemző szerkezeti tulajdonságokat mutatott. Eredményeink összevágának azzal a ténnyel, hogy természetesen előforduló izoformák a vizsgált csuklópánt pozíciók közül csak a 193-as esetében léteznek: a humán tripszin 4-en kívül pl. a patkány tripszin 5-A tirozint (Kang és mtsai, 1992), míg a *Trimeresurus stejnegeri* plazminogén aktivátor fenilalanint (Braud és mtsai, 2000) tartalmaz ebben a pozícióban. A zimogén/aktív átalakulás molekula dinamikai szimulációja a kimotripszin esetében azt mutatta, hogy a Gly193 diédeses szögei csak az aktivációs folyamat végén mennek át jelentős változáson (Mátrai és mtsai, 2004). Úgy tűnik, a Gly193 konformációját a teljes környező peptidszegmens konformációja határozza meg, ami megmagyarázza ezen pozíció nagy ellenállóképességét a bevitt mutációkkal szemben. Schmidt és munkatársai ezzel ellentétben azt találták, hogy a Gly193 [555] aszparaginsavval történő helyettesítése a XI-es véralvadási faktorban befolyásolja az aktív forma szerkezetét: a mutáció hatására nem alakul ki az Ile16 [370] és Asp194 [556] közötti sóhíd, valamint torzul az S1 kötőhely és az oxianion lyuk is (Schmidt és mtsai, 2004). Másfelől ugyanez a mutáció a VII-es faktorban nem okoz klinikai tüneteket (Bernardi és mtsai, 1996). A különböző aminosavak által történő szubsztitúció esetén kapott eredmények közti ellentmondást a humán tripszin 4 kristályszerkezete alapján kísérlelhetjük meg feloldani (Katona és mtsai, 2002). A Katona és munkatársai által meghatározott szerkezetben az Arg193 oldallánca egy mélyedésben helyezkedik el,

és a Tyr151 aromás gyűrűjével való kölcsönhatás stabilizálja ebben a pozícióban. A humán tripszin 1-gyel összehasonlítva, amely egy konzervált glicint tartalmaz a 193-as helyen, a Tyr151 környezetében — a nagy szekvencia homológia ellenére — a Ca atomok eltérése meghaladja az 1 Å-öt. Az Arg193 specifikus interakciói tehát hozzájárulhatnak az aktív konformáció stabilizálásához. Ezt az elképzelést az is alátámasztja, hogy kísérleteink során az R193A mutánsra kapott eredmények — a vad típusú enzimmel szemben — valamelyest ellentmondások: bár az R193A humán tripszin 4 N-terminálisa eltemetett és aktív helye is szubsztrátkötésre alkalmas állapotban van, az autolízis hurok csekély mértékben hasítható. Eredményeink szerint tehát ezen mutáns szerkezete nem teljes mértékben aktív. Ennek magyarázata lehet az arginin oldalláncát stabilizáló kölcsönhatások hiánya. Ezt a hipotézist a G193A trombin mutáns kristályszerkezete is megerősíti (Bobofchak és mtsai, 2005). A mutáció hatására nem változik számottevő módon az enzim globális szerkezete, és az alanin oldallánca nem akadályozza az inhibitor kötést. Érdekes módon azonban az autolízis hurok rendezetlen szerkezetűvé válik.

A másik három általunk tanulmányozott csuklópont érzékenyebb a glicin/arginin csere hatására. Eredményeink alapján azonban az egyes mutációk eltérő mértékben befolyásolják a tripszin szerkezetét. Az R193G/G184A mutáns szerkezete részben, míg az R193G/G142A mutánsé jellemző módon zimogénszerű. Az R193G/G142A mutánsra kapott eredmények összefügghetnek a Gly142-nek az aktív forma stabilizálásában betöltött további szerepével oly módon, hogy az aktív formában hidrogénhidás kölcsönhatást alakít ki mind az N-terminális Ile16-tal, mind pedig az Asp194-gyel. A tripszinogén szerkezetéből ugyanakkor hiányoznak ezek a kölcsönhatások. Így ez a pozíció különösen érzékeny lehet a glicin szubsztitúciójára. Az R193G/G19A mutáns egyfelől zimogénszerű tulajdonságokat mutat, szabad N-terminálissal és deformált aktív hellyel, másfelől azonban az autolízis hurok ellenáll a limitált proteolitikus hasításnak. Ezt a különös viselkedést részben megmagyarázhatjuk a humán tripszin 4 kristályszerkezete alapján: az N-terminális közvetlen kapcsolatban áll a szubsztrátkötő hellyel, mivel hidrogénhidak kötik össze a Val17N-t és az Asp189O-t, valamint az Asp189N-t és a Val17O-t. Így az N-terminális konformációjának megváltozása közvetlenül továbbadódhat az aktív helyre anélkül, hogy más, az aktivációs domén kialakításában részt vevő peptidszakasz szerkezetét jelentősen megváltoztatná.

A különböző szerkezeti próbákkal kapott eredmények közötti eltérések arra utalnak, hogy az egyes csuklópánt mutánsok különféle átmeneti állapotokat képviselnek

a teljes mértékben inaktív, zimogénszerű és az aktív, tripszinszerű konformációk között. Adataink összhangban állnak alacsony hőmérsékletű röntgen-kristallográfiás vizsgálatok eredményeivel is, melyek azt mutatják, hogy maga a tripszinogén is számos különböző konformációs állapotban létezik (Walter és mtsai, 1982). Perturbált szögű  $\gamma$ -korrelációs spektroszkópiai vizsgálatok szerint a különböző konformerek közti átalakulás a nanoszekundumos időskálán zajlik, míg az aktív formában nem figyelhetők meg dinamikus folyamatok ezen az időskálán (Huber és Bennett, 1983).

A tetraéderes átmeneti állapot analóg D-MePhe-Pro-Arg-aldehid kötődése a zimogénszerű formákhoz helyreállította az aktív szerkezetet mind a limitált proteolízis, mind az N-terminális karbamilálása alapján. Ezek az eredmények megerősítik, hogy a bevitt mutációk következtében a tripszin molekula szerkezete nem torzult jelentősen. Feltételezésünk szerint a csuklópánt glicinek szubsztitúciójának hatására a jól meghatározott, tripszinszerű és a zimogénszerű állapotok közti egyensúly tolódott el a zimogénszerű formák irányába. A szubsztrát analóg kötődése stabilizálja az aktív formát, így a tripszinszerű állapot irányába tolja el az egyensúlyt.

A Z-Gly-Pro-Arg p-nitroanilid hidrolízis kinetikáját a Michaelis-Menten modell alapján elemeztük. Adataink azt mutatják, hogy a csuklópánt glicinek szubsztitúciója hatására a katalitikus hatékonyság csökken, és a csökkenés mértéke korrelál a szerkezet zimogénszerű voltával. Az aktivációs domén szerkezetébe való más módon történő beavatkozás is hasonló eredményre vezetett: különböző Ile16 mutáns tripszinek aktivációs doménjének stabilitása jól korrelált a  $k_{\text{cat}}/K_M$  értékekkel (Hedstrom és mtsai, 1996). A kinetikai mérések és a szerkezeti próbák eredményeit összevetve azt láthatjuk, hogy a katalitikus hatékonyság az aktív hely konformációjával hozható összefüggésbe, ugyanakkor meglehetősen független az N-terminális és az autolízis hurok állapotától (14. táblázat). Ebből arra következtethetünk, hogy a katalízishez elengedhetetlen az S1 hely működőképes konformációja, ami azonban az aktivációs domén más részeinek különböző állapotaival társulhat. Hasonló következtetést lehet levonni megnövelt aktivitással rendelkező tripszinogén mutánsok BPTI komplexe kristályszerkezete alapján is (Pasternak és mtsai, 2001). A különböző mutánsok S1 helyének és oxianion zsebének szerkezete hasonló a tripszinéhez, míg az N-terminális és az autolízis hurok konformációja változatos.

A katalitikus hatékonyság csökkenésének oka elsősorban a megnövekedett  $K_M$  érték, míg a  $k_{\text{cat}}$  értékét csak kismértékben befolyásolják a mutációk. A  $k_{\text{cat}}$  legnagyobb mértékű csökkenése egy nagyságrend az R193G/G142A mutáns esetében. Itt azonban a

megadott érték csak alsó határ, nem határozható meg pontosan a mutáns igen magas  $K_M$ -je miatt. Ennek alapján szintén elmondhatjuk, hogy a mutációk nem zavarják jelentősen a natív szerkezet kialakulását. Ezt a következtetést az is megerősíti, hogy a vizsgált enzimvariánsok esetében a jó és rossz szubsztráton mért  $k_{cat}/K_M$  értékek, valamint egy — átmeneti állapot analógnak tekinthető — inhibitor  $K_I$  értéke jól korrelál (Hedstrom és mtsai, 1994). Ebből adódik az a következtetés, hogy az átmeneti állapot hasonló a különböző variánsok esetében, és a szubsztrát hidrolízise azonos mechanizmussal történik (Hedstrom, 2002). Feltételezhető, hogy ha a mutációk érintenék a katalitikus apparátust, jó szubsztrátok hidrolízisére nagyobb hatást gyakorolnának (Hedstrom és mtsai, 1996). A  $K_M$  értékekben tapasztalt növekedés ezzel szemben — különösen a szerkezeti próbák eredményei tükrében — arra utal, hogy az inaktív/aktív egyensúly eltolódott az inaktív forma irányába, és magas szubsztrátkoncentráció szükséges, hogy eltolja az egyensúlyt az aktív konformáció felé.

MUGB szubsztrát analógon végzett tranziens kinetikai mérések, melyek lehetővé teszik egyes elemi reakciólépések elkülönítését, megerősítették a — szubsztrátkötést megelőző — inaktív/aktív konformációs átmenet szerepét. Ezen túlmenően azonban a mutációk az első tetraédes átmeneti állapot kialakulására is hatást gyakorolhatnak, és a lépés megfigyelt sebességi állandójának csökkenése jól korrelál a szerkezet zimogenitásának mértékével. Mivel a későbbi reakciólépéseket — az acilezést és dezacilezést — alig érintik a mutációk, úgy véljük, hogy a tetraédes átmeneti állapot kialakulása során indukált illeszkedés mechanizmussal helyreáll az aktív szerkezet. Ezt az elgondolást a gyorskinetikai méréseken túl a tetraédes átmeneti állapot analóg jelenlétében végzett limitált proteolízis és N-terminális módosítás eredményei, valamint az egyensúlyi kinetikai mérések során kapott viszonylag állandó  $k_{cat}$  értékek is alátámasztják. Eredményeinket termodinamikai és izotóphatás vizsgálatok is megerősítik (Case és Stein, 2003; Hengge és Stein, 2004). Ezek felfedték, hogy a szubsztrátkötés az enzim konformációs változását eredményezheti az acilezés során, ami elősegíti a katalízist. Továbbá Hedstrom és munkatársai azt találták, hogy az Ile16 oldalláncának mutációi, melyek destabilizálják a tripszin aktivációs doménjét, szelektíven csökkentik az acilezés sebességét, míg a szubsztrátkötést és a dezacilezést nem befolyásolják (Hedstrom és mtsai, 1996).

Eredményeinket összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a csuklópánt glicinek alaninnal történő helyettesítése különböző mértékben gátolja az aktív konformáció kialakulását. Valamennyi, a 193-as pozícióban különböző aminosavat tartalmazó forma

teljesen aktív. Az egyéb csuklópozíciókat érintő mutációk azonban — különböző mértékben — eltolják a zímogén/aktív konformációs egyensúlyt az inaktív forma irányába. Ez a jelenség teljesen megmagyarázza az R193G/G19A mutáns viselkedését mind a szerkezeti próbák, mind a kinetikai mérések során. A 184-es és 142-es csuklópánt glicinek szubsztitúciója azonban kiterjedtebb szerkezeti változásokat okoz az enzim-molekulában. Eredményeink alapján az R193G/G184A mutáns szubsztrát távollétében nem kerül teljes mértékben aktív konformációba. Ez csak a katalitikus ciklus során, az első tetraéderes átmeneti állapot kialakulásakor történik meg, vagyis indukált illeszkedésről beszélhetünk. A 142-es csuklópánt glicin szubsztitúciója esetén a teljes mértékben aktív szerkezet nem képes kialakulni.



## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám során a szerin proteázok működésének különböző aspektusait — a katalitikus mechanizmust, a szubsztrátkötést, valamint az inaktív/aktív konformációs átalakulást — vizsgáltam a humán tripszin 4 példáján. Ez a tripszin a konzervált glicin helyett arginint tartalmaz a 193-as pozícióban. Ez az aminosav különleges módon a szerin proteázok mindhárom strukturális elemének tagja, így részt vesz az átmeneti állapotot stabilizáló oxianion lyuk kialakításában, része az S2' szubsztrátkötő zsebnek, valamint a zimogén aktivációs domén egyik fontos csuklópántja is.

A 193-as glicin nagyméretű aminosavakkal — argininnel, fenilalaninnal és tirozinnal — történő szubsztitúciójának a különböző szubsztrátokkal és inhibitorokkal szembeni hatását többféle fehérjekörnyezetben is megvizsgáltuk. Kisméretű, P' oldali aminosavakkal nem rendelkező szubsztrátok, illetve inhibitorok esetében azt tapasztaltuk, hogy a mutációk a kötési lépést nem befolyásolják. Mind a  $k_{\text{cat}}$ , mind a  $K_M$  értékek kismértékű növekedése volt megfigyelhető, így összességében a katalitikus hatékonyság nem változott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a dezacilezés sebessége nő. Nagyméretű, fehérjetermészetű kölcsönható partnerek (szubsztrát, illetve inhibitorok) esetében az enzim felszínén való megkötődés sztérikus gátlása válik dominánssá a nagyméretű oldalláncok következtében.

A protonleltár mérések azt mutatják, hogy a katalitikus mechanizmus a mutáció hatására nem változik alapvetően. Mindazonáltal méréseink arra utalnak, hogy a 193-as glicin argininnel történő helyettesítése hatására az oxianion lyuk szerkezete torzul. A mutáció hatását az enzim katalitikus mechanizmusára MUGB szubsztrát analógon tranzien্স kinetikai módszerrel részletesen is elemeztük. Eredményeink alapján a reakció leírására egy, a korábbiaknál részletesebb modellt állítottunk fel, melyben a tetraéderes átmeneti állapot reverzibilis kialakulása megkülönböztethető az acil-enzim keletkezésétől. A tranzien্স kinetikai vizsgálatok — az egyensúlyi mérésekből levonható következtetésekkel összhangban — azt mutatják, hogy a glicin/arginin csere hatására az első tetraéderes átmeneti állapot kialakulásának sebessége csökken, míg a dezacilezés sebessége nő. További termodinamikai vizsgálatok megmutatták, hogy a sebességcsökkenés háttérben szerkezeti átrendeződések állnak (Tóth és mtsai, 2006).

Az aktivációs domén egyes csuklópontjai körüli konformációs flexibilitást tanulmányozva azt kaptuk, hogy a flexibilitást csökkentve a zimogén/aktív egyensúly az

inaktív forma irányába tolódik el. A glicin/alanin csuklópánt mutáns enzimek szerkezete az aktív formában is zimogénszerű jellegzetességeket mutatott, az egyes enzimek szerkezete azonban eltérőnek bizonyult. A katalitikus aktivitás az aktív hely katalízisre alkalmas konformációjának mértékével mutatott összefüggést.

Tekintve, hogy a tripszinszerű szerin proteázok számos élettani folyamatban fontos szerepet játszanak, munkánk különböző betegségek, mint pl. hemofiliák molekuláris mechanizmusába is betenkitést nyújt.

## 6. SUMMARY

In the course of my Ph.D. work I studied different aspects of the action of serine proteases, *e.g.* catalytic mechanism, substrate binding and the inactive/active conformational transition, exemplified by human trypsin 4. This trypsin contains an arginine instead of a conserved glycine at position 193. Residue 193 is involved in the composition of all three structural components of serine proteases. It is part of the oxyanion hole, which stabilizes the tetrahedral intermediate, and the S2' substrate binding pocket, moreover, it is a hinge of the zymogen activation domain.

Substitution of Gly193 by amino acids with large side chains, such as arginine, phenylalanine and tyrosine was studied toward different substrates and inhibitors in various protein environments. In the case of substrates and inhibitors without prime side residues the mutations have no effect on the binding step. On the other hand, both  $k_{\text{cat}}$  and  $K_{\text{M}}$  values increase, which together result in no change of the catalytic efficiency. Our results suggest that the rate of deacylation is increased in the mutant enzymes. In the case of a protein substrate and proteinaceous inhibitors steric hindrance of the binding on the enzyme surface predominates.

Proton inventory measurements show that the catalytic mechanism is not affected by substitution of Gly193. Nevertheless, our results suggest that the oxyanion hole is perturbed. The effect of the mutation on the catalytic mechanism was studied in detail using MUGB substrate analogue and transient kinetic methods. On the basis of our results we propose a refined reaction mechanism in that reversible formation of the tetrahedral intermediate is separated from formation of the acyl-enzyme. The transient kinetic measurements, in concert with the results of the steady-state experiments, show that the rate of formation of the first tetrahedral intermediate is decreased, while the rate of deacylation is increased as a result of the amino acid substitution. Further thermodynamic investigations revealed that structural rearrangements occur in human trypsin 4 during formation of the first tetrahedral intermediate (Tóth és mtsai, 2006).

We also studied the role of conformational flexibility around hinge glycines of the activation domain. Restriction of flexibility by replacing hinge glycines by alanines results in a shift of the inactive/active conformational equilibrium toward the inactive form. Hinge mutant enzymes are characterized by zymogen-like properties in the active form, although to different extents. Catalytic activity correlates with proper conformation of the active site.

As trypsin-like serine proteases play important roles in diverse physiological processes, our work also sheds light on the pathomechanism of various diseases, *e.g.* haemophilias.

## A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

**Gombos, L.,** Kardos, J., Patthy, A., Medveczky, P., Szilágyi, L., Málnási-Csizmadia, A., and Gráf, L. (2008) Probing conformational plasticity of the activation domain of trypsin: the role of glycine hinges. *Biochemistry* **47**(6): 1675-1684.

Tóth, J., Simon, Z., Medveczky, P., **Gombos, L.,** Jelinek, B., Szilágyi, L., Gráf, L., and Málnási-Csizmadia, A. (2007) Site directed mutagenesis at position 193 of human trypsin 4 alters the rate of conformational change during activation: role of local internal friction in protein dynamics. *Proteins* **67**(4):1119-1127.

Tóth, J., **Gombos, L.,** Simon, Z., Medveczky, P., Szilágyi, L., Gráf, L., and Málnási-Csizmadia, A. (2006) Thermodynamic analysis reveals structural rearrangement during the acylation step in human trypsin 4 on 4-methylumbelliferyl 4-guanidinobenzoate substrate analogue. *J. Biol. Chem.* **281**(18): 12596-12602.

**Gombos, L.,** Tóth, J., Medveczky, P., Málnási-Csizmadia, A., and Szilágyi L. (2005) Comparative kinetic study on S2' trypsin variants. *FEBS J.* **272**(s1): 168.

## IRODALOMJEGYZÉK

- Alm, A. K., Gagnemo-Persson, R., Sorsa, T., and Sundelin, J. (2000) Extrapancratic trypsin-2 cleaves proteinase-activated receptor-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**(1), 77-83.
- Alvarez, F. J., and Schowen, R. L. (1987) Mechanistic deductions from solvent isotope effects. In "Isotopes in organic chemistry" (E. Buncl, and C. C. Lee, Eds.), pp. 1-60. Elsevier, Amsterdam.
- Alvarez, F. J., and Schowen, R. L. (1987) Mechanistic deductions from solvent isotope effects. In "Isotopes in organic chemistry" (E. Buncl, and C. C. Lee, Eds.), pp. 177-273. Elsevier, Amsterdam.
- Au, L. C., Lin, S. B., Chou, J. S., Teh, G. W., Chang, K. J., and Shih, C. M. (1993) Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for ancrod, a thrombin-like enzyme from the venom of *Calloselasma rhodostoma*. *Biochem. J.* **294** (Pt 2), 387-390.
- Bajusz, S., Barabás, E., Tolnay, P., Széll, E., and Bagdy, D. (1978) Inhibition of thrombin and trypsin by tripeptide aldehydes. *Int. J. Pept. Protein Res.* **12**(4), 217-221.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D., and Woessner, F. F., Jr., Eds. (1998) Handbook of proteolytic enzymes. London, UK; San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Barrett, A. J., and Starkey, P. M. (1973) The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem. J.* **133**(4), 709-724.
- Bender, M. L., Begue-Cantón, M. L., Blakeley, R. L., Brubacher, L. J., Feder, J., Gunter, C. R., Kézdy, F. J., Killheffer, J. V., Jr., Marshall, T. H., Miller, C. G., Roeske, R. W., and Stoops, J. K. (1966) The determination of the concentration of hydrolytic enzyme solutions: alpha-chymotrypsin, trypsin, papain, elastase, subtilisin, and acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **88**(24), 5890-5913.
- Bender, M. L., and Hamilton, G. A. (1962) Kinetic isotope effects of deuterium oxide on several  $\alpha$ -chymotrypsin-catalyzed reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **84**(13), 2570-2576.
- Bernardi, F., Castaman, G., Pinotti, M., Ferraresi, P., Di Iasio, M. G., Lunghi, B., Rodeghiero, F., and Marchetti, G. (1996) Mutation pattern in clinically asymptomatic coagulation factor VII deficiency. *Hum. Mutat.* **8**(2), 108-115.
- Bernhard, S. A., and Gutfreund, H. (1965) The optical detection of transients in trypsin- and chymotrypsin-catalyzed reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **53**(6), 1238-1243.
- Betzel, C., Dauter, Z., Genov, N., Lamzin, V., Navaza, J., Schnebli, H. P., Visanji, M., and Wilson, K. S. (1993) Structure of the proteinase inhibitor eglin c with hydrolysed reactive centre at 2.0 Å resolution. *FEBS Lett.* **317**(3), 185-188.
- Blow, D. M., Birktoft, J. J., and Hartley, B. S. (1969) Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* **221**(5178), 337-340.
- Bobofchak, K. M., Pineda, A. O., Mathews, F. S., and Di Cera, E. (2005) Energetic and structural consequences of perturbing Gly-193 in the oxyanion hole of serine proteases. *J. Biol. Chem.* **280**(27), 25644-25650.
- Bode, W., and Huber, R. (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **204**(2), 433-451.

- Bode, W., Papamokos, E., and Musil, D. (1987) The high-resolution X-ray crystal structure of the complex formed between subtilisin Carlsberg and eglin c, an elastase inhibitor from the leech *Hirudo medicinalis*. Structural analysis, subtilisin structure and interface geometry. *Eur. J. Biochem.* **166**(3), 673-692.
- Bode, W., and Renatus, M. (1997) Tissue-type plasminogen activator: variants and crystal/solution structures demarcate structural determinants of function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**(6), 865-872.
- Bode, W., and Schwager, P. (1975) The refined crystal structure of bovine beta-trypsin at 1.8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. *J. Mol. Biol.* **98**(4), 693-717.
- Bode, W., Schwager, P., and Huber, R. (1978) The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. The refined crystal structures of the bovine trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **118**(1), 99-112.
- Bode, W., Turk, D., and Karshikov, A. (1992) The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci.* **1**(4), 426-471.
- Bohe, M., Borgstrom, A., Lindstrom, C., and Ohlsson, K. (1986) Pancreatic endoproteases and pancreatic secretory trypsin inhibitor immunoreactivity in human Paneth cells. *J. Clin. Pathol.* **39**(7), 786-793.
- Bohm, S. K., Kong, W., Bromme, D., Smeekens, S. P., Anderson, D. C., Connolly, A., Kahn, M., Nelken, N. A., Coughlin, S. R., Payan, D. G., and Bunnett, N. W. (1996) Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem. J.* **314** (Pt 3), 1009-1016.
- Bott, R. R., Chan, G., Domingo, B., Ganshaw, G., Hsia, C. Y., Knapp, M., and Murray, C. J. (2003) Do enzymes change the nature of transition states? Mapping the transition state for general acid-base catalysis of a serine protease. *Biochemistry* **42**(36), 10545-10553.
- Braud, S., Parry, M. A., Maroun, R., Bon, C., and Wisner, A. (2000) The contribution of residues 192 and 193 to the specificity of snake venom serine proteinases. *J. Biol. Chem.* **275**(3), 1823-1828.
- Brouwer, A. C., and Kirsch, J. F. (1982) Investigation of diffusion-limited rates of chymotrypsin reactions by viscosity variation. *Biochemistry* **21**(6), 1302-1307.
- Brünger, A. T., Huber, R., and Karplus, M. (1987) Trypsinogen-trypsin transition: a molecular dynamics study of induced conformational change in the activation domain. *Biochemistry* **26**(16), 5153-5162.
- Buczek, O., Krowarsch, D., and Otlewski, J. (2002) Thermodynamics of single peptide bond cleavage in bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). *Protein Sci.* **11**(4), 924-932.
- Burger, M. M. (1970) Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth. *Nature* **227**(5254), 170-171.
- Camire, R. M. (2002) Prothrombinase assembly and S1 site occupation restore the catalytic activity of FXa impaired by mutation at the sodium-binding site. *J. Biol. Chem.* **277**(40), 37863-37870.
- Case, A., and Stein, R. L. (2003) Mechanistic origins of the substrate selectivity of serine proteases. *Biochemistry* **42**(11), 3335-3348.
- Castro, H. C., Silva, D. M., Craik, C., and Zingali, R. B. (2001) Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochim. Biophys. Acta* **1547**(2), 183-195.

- Chance, B. (1940) The accelerated flow method for rapid reactions. *J. Franklin Inst.* **229**(4, 5, 6), 455-476, 613-640, 737-766.
- Chase, T., Jr., and Shaw, E. (1967) p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate HCl: a new active site titrant for trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**(4), 508-514.
- Collen, D., and Lijnen, H. R. (1986) The fibrinolytic system in man. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **4**(3), 249-301.
- Conti, E., Rivetti, C., Wonacott, A., and Brick, P. (1998) X-ray and spectrophotometric studies of the binding of proflavin to the S1 specificity pocket of human alpha-thrombin. *FEBS Lett.* **425**(2), 229-233.
- Corey, D. R., and Craik, C. S. (1992) An investigation into the minimum requirements for peptide hydrolysis by mutation of the catalytic triad of trypsin. *J. Am. Chem. Soc.* **114**(5), 1784-1790.
- Cottrell, G. S., Amadesi, S., Grady, E. F., and Bunnett, N. W. (2004) Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. *J. Biol. Chem.* **279**(14), 13532-13539.
- Craik, C. S., Largman, C., Fletcher, T., Rocznik, S., Barr, P. J., Fletterick, R., and Rutter, W. J. (1985) Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity. *Science* **228**(4697), 291-297.
- Craik, C. S., Rocznik, S., Largman, C., and Rutter, W. J. (1987) The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases. *Science* **237**(4817), 909-913.
- Critchley, G., Sumar, N., O'Neill, K., Hermon-Taylor, J., and Bell, B. A. (2000) Cerebral trypsinogen expression in human and rat cerebrospinal fluid. *Neurosci. Lett.* **283**(1), 13-16.
- Czapinska, H., and Otlewski, J. (1999) Structural and energetic determinants of the S1-site specificity in serine proteases. *Eur. J. Biochem.* **260**(3), 571-595.
- de Haën, C., Neurath, H., and Teller, D. C. (1975) The phylogeny of trypsin-related serine proteases and their zymogens. New methods for the investigation of distant evolutionary relationships. *J. Mol. Biol.* **92**(2), 225-259.
- DeLano, W. L. (2002) The PyMOL molecular graphics system. Palo Alto, CA, USA: DeLano Scientific
- Dery, O., Corvera, C. U., Steinhoff, M., and Bunnett, N. W. (1998) Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am. J. Physiol.* **274**(6 Pt 1), C1429-1452.
- Diederichs, S., Bulk, E., Steffen, B., Ji, P., Tickenbrock, L., Lang, K., Zanker, K. S., Metzger, R., Schneider, P. M., Gerke, V., Thomas, M., Berdel, W. E., Serve, H., and Muller-Tidow, C. (2004) S100 family members and trypsinogens are predictors of distant metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **64**(16), 5564-5569.
- Ding, S., Ingleby, L., Ahern, C. A., and Horn, R. (2005) Investigating the putative glycine hinge in Shaker potassium channel. *J. Gen. Physiol.* **126**(3), 213-226.
- Dodson, G., and Wlodawer, A. (1998) Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem. Sci.* **23**(9), 347-352.
- Drapkin, P. T., Monard, D., and Silverman, A. J. (2002) The role of serine proteases and serine protease inhibitors in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. *BMC Dev. Biol.* **2**, 1.
- Duda, C. T., and Light, A. (1982) Refolding of bovine threonine-neochymotrypsinogen. *J. Biol. Chem.* **257**(16), 9866-9871.
- Duggleby, R. G., and Clarke, R. B. (1991) Experimental designs for estimating the parameters of the Michaelis-Menten equation from progress curves of enzyme-catalyzed reactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1080**(3), 231-236.



- Duncan, M. E., Richardson, J. P., Murray, G. I., Melvin, W. T., and Fothergill, J. E. (1998) Human matrix metalloproteinase-9: activation by limited trypsin treatment and generation of monoclonal antibodies specific for the activated form. *Eur. J. Biochem.* **258**(1), 37-43.
- Elliott, P. R., Abrahams, J. P., and Lomas, D. A. (1998) Wild-type alpha 1-antitrypsin is in the canonical inhibitory conformation. *J. Mol. Biol.* **275**(3), 419-425.
- Emi, M., Nakamura, Y., Ogawa, M., Yamamoto, T., Nishide, T., Mori, T., and Matsubara, K. (1986) Cloning, characterization and nucleotide sequences of two cDNAs encoding human pancreatic trypsinogens. *Gene* **41**(2-3), 305-310.
- Enyedy, E. J., and Kovach, I. M. (2004) Proton inventory studies of alpha-thrombin-catalyzed reactions of substrates with selected P and P' sites. *J. Am. Chem. Soc.* **126**(19), 6017-6024.
- Estell, D. A., Wilson, K. A., and Laskowski, M., Jr. (1980) Thermodynamics and kinetics of the hydrolysis of the reactive-site peptide bond in pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz) by *Dermasterias imbricata* trypsin I. *Biochemistry* **19**(1), 131-137.
- Fehlhammer, H., Bode, W., and Huber, R. (1977) Crystal structure of bovine trypsinogen at 1.8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, refined crystal structure and comparison with bovine trypsin. *J. Mol. Biol.* **111**(4), 415-438.
- Fersht, A. R. (1971) Conformational equilibria and the salt bridge in chymotrypsin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **36**, 71-73.
- Fersht, A. R. (1972) Conformational equilibria in  $\alpha$ - and  $\gamma$ -chymotrypsin. The energetics and importance of the salt bridge. *J. Mol. Biol.* **64**(2), 497-509.
- Fersht, A. R. (1985) "Enzyme structure and mechanism." W. H. Freeman and Company, New York, U.S.A.
- Fersht, A. R. (1999) "Structure and mechanism in protein science." W. H. Freeman, New York, U.S.A.
- Fersht, A. R., and Requena, Y. (1971) Equilibrium and rate constants for the interconversion of two conformations of  $\alpha$ -chymotrypsin. The existence of a catalytically inactive conformation at neutral pH. *J. Mol. Biol.* **60**(2), 279-290.
- Fiedler, F. (1987) Effects of secondary interactions on the kinetics of peptide and peptide ester hydrolysis by tissue kallikrein and trypsin. *Eur. J. Biochem* **163**(2), 303-312.
- Figarella, C., Miszczuk-Jamska, B., and Barrett, A. J. (1988) Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. Activation of both human trypsinogens by cathepsin B and spontaneous acid. Activation of human trypsinogen I. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **369 Suppl**, 293-298.
- Fletcher, T. S., Alhadeff, M., Craik, C. S., and Largman, C. (1987) Isolation and characterization of a cDNA encoding rat cationic trypsinogen. *Biochemistry* **26**(11), 3081-3086.
- Ganrot, P. O. (1966) Determination of alpha-2-macroglobulin as trypsin-protein esterase. *Clin. Chim. Acta.* **14**(4), 493-501.
- Gettins, P. G. (2002) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.* **102**(12), 4751-4804.
- Giannelli, F., Green, P. M., Sommer, S. S., Lillicrap, D. P., Ludwig, M., Schwaab, R., Reitsma, P. H., Goossens, M., Yoshioka, A., and Brownlee, G. G. (1994) Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions, fifth edition, 1994. *Nucleic Acids Res.* **22**(17), 3534-3546.

- Gráf, L. (1995) Structural basis of serine protease action: The fourth dimension. In "Natural sciences and human thought" (R. Zwilling, Ed.), pp. 139-148. Springer, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Gráf, L., Craik, C. S., Patthy, A., Rocznik, S., Fletterick, R. J., and Rutter, W. J. (1987) Selective alteration of substrate specificity by replacement of aspartic acid-189 with lysine in the binding pocket of trypsin. *Biochemistry* **26**(9), 2616-2623.
- Gráf, L., Jancsó, Á., Szilágyi, L., Hegyi, G., Pintér, K., Náray-Szabó, G., Hepp, J., Medzihradsky, K., and Rutter, W. J. (1988) Electrostatic complementarity within the substrate-binding pocket of trypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**(14), 4961-4965.
- Grahn, S., Kurth, T., Ullmann, D., and Jakubke, H. D. (1999) S' subsite mapping of serine proteases based on fluorescence resonance energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1431**(2), 329-337.
- Grahn, S., Ullmann, D., and Jakubke, H. (1998) Design and synthesis of fluorogenic trypsin peptide substrates based on resonance energy transfer. *Anal. Biochem.* **265**(2), 225-231.
- Green, D. (2006) Coagulation cascade. *Hemodial. Int.* **10 Suppl 2**, S2-4.
- Grishina, Z., Ostrowska, E., Halangk, W., Sahin-Toth, M., and Reiser, G. (2005) Activity of recombinant trypsin isoforms on human proteinase-activated receptors (PAR): mesotrypsin cannot activate epithelial PAR-1, -2, but weakly activates brain PAR-1. *Br. J. Pharmacol.* **146**(7), 990-999.
- Gross, P., Steiner, H., and Krauss, F. (1936a) On the decomposition of diazo-acetic ester catalysed by protons and deuterons. *Trans. Faraday Soc.* **32**, 877-879.
- Gross, P., Steiner, H., and Suess, H. (1936b) The inversion of cane sugar in mixtures of light and heavy water. *Trans. Faraday Soc.* **32**, 883-889.
- Gross, P., and Wischin, A. (1936) On the distribution of picric acid between benzene and mixtures of light and heavy water. *Trans. Faraday Soc.* **32**, 879-883.
- Grutter, M. G., Priestle, J. P., Rahuel, J., Grossenbacher, H., Bode, W., Hofsteenge, J., and Stone, S. R. (1990) Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition. *EMBO J.* **9**(8), 2361-2365.
- Harpel, P. C. (1973) Studies on human plasma alpha 2-macroglobulin-enzyme interactions. Evidence for proteolytic modification of the subunit chain structure. *J. Exp. Med.* **138**(3), 508-521.
- Hartley, B. S., Brown, J. R., Kauffman, D. L., and Smillie, L. B. (1965) Evolutionary similarities between pancreatic proteolytic enzymes. *Nature* **207**(5002), 1157-1159.
- Hedstrom, L. (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* **102**(12), 4501-4524.
- Hedstrom, L., Farr-Jones, S., Kettner, C. A., and Rutter, W. J. (1994) Converting trypsin to chymotrypsin: ground-state binding does not determine substrate specificity. *Biochemistry* **33**(29), 8764-8769.
- Hedstrom, L., Lin, T. Y., and Fast, W. (1996) Hydrophobic interactions control zymogen activation in the trypsin family of serine proteases. *Biochemistry* **35**(14), 4515-4523.
- Hedstrom, L., Szilágyi, L., and Rutter, W. J. (1992). Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. *Science* **255**(5049), 1249-1253.
- Henderson, R. (1970) Structure of crystalline alpha-chymotrypsin. IV. The structure of indoleacryloyl-alpha-chymotrypsin and its relevance to the hydrolytic mechanism of the enzyme. *J. Mol. Biol.* **54**(2), 341-354.

- Henderson, R. (1971) Catalytic activity of  $\alpha$ -chymotrypsin in which histidine-57 has been methylated. *Biochem. J.* **124**(1), 13-18.
- Hengge, A. C., and Stein, R. L. (2004) Role of protein conformational mobility in enzyme catalysis: Acylation of alpha-chymotrypsin by specific peptide substrates. *Biochemistry* **43**(3), 742-747.
- Henschen-Edman, A. H., Theodor, I., Edwards, B. F., and Pirkle, H. (1999) Crotalase, a fibrinogen-clotting snake venom enzyme: primary structure and evidence for a fibrinogen recognition exosite different from thrombin. *Thromb. Haemost.* **81**(1), 81-86.
- Higaki, J. N., and Light, A. (1986) Independent refolding of domains in the pancreatic serine proteinases. *J. Biol. Chem.* **261**(23), 10606-10609.
- Hiraga, K., Suzuki, T., and Oda, K. (2000) A novel double-headed proteinaceous inhibitor for metalloproteinase and serine proteinase. *J. Biol. Chem.* **275**(33), 25173-25179.
- Hiroara, H., Bender, M. L., and Stark, R. S. (1974) Acylation of alpha-chymotrypsin by oxygen and sulfur esters of specific substrates: kinetic evidence for a tetrahedral intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**(5), 1643-1647.
- Honey, N. K., Sakaguchi, A. Y., Lalley, P. A., Quinto, C., MacDonald, R. J., Craik, C., Bell, G. I., Rutter, W. J., and Naylor, S. L. (1984) Chromosomal assignments of genes for trypsin, chymotrypsin B, and elastase in mouse. *Somat. Cell. Mol. Genet.* **10**(4), 377-383.
- Honey, N. K., Sakaguchi, A. Y., Quinto, C., MacDonald, R. J., Bell, G. I., Craik, C., Rutter, W. J., and Naylor, S. L. (1984) Chromosomal assignments of human genes for serine proteases trypsin, chymotrypsin B, and elastase. *Somat. Cell. Mol. Genet.* **10**(4), 369-376.
- Hornel, J. C., and Butler, J. A. V. (1936) The rates of some acid- and base-catalysed reactions, and the dissociation constants of weak acids in heavy water. *J. Chem. Soc.*, 1361-1366.
- Hubbard, S. J. (1998) The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1382**(2), 191-206.
- Huber, R., and Bennett, W. S., Jr. (1983) Functional significance of flexibility in proteins. *Biopolymers* **22**(1), 261-279.
- Huber, R., and Bode, W. (1978) Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc. Chem. Res.* **11**(3), 114-122.
- Hunkapiller, M. W., Forgac, M. D., and Richards, J. H. (1976) Mechanism of action of serine proteases: tetrahedral intermediate and concerted proton transfer. *Biochemistry* **15**(25), 5581-5588.
- Huntington, J. A., Read, R. J., and Carrell, R. W. (2000) Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* **407**(6806), 923-926.
- Ishida, T., and Kato, S. (2003) Theoretical perspectives on the reaction mechanism of serine proteases: The reaction free energy profiles of the acylation process. *J. Am. Chem. Soc.* **125**(39), 12035-12048.
- Iitkonen, O., Stenman, U. H., Osman, S., Koivunen, E., Halila, H., and Schroder, T. (1996) Serum samples from pancreatectomized patients contain trypsinogen immunoreactivity. *J. Lab. Clin. Med.* **128**(1), 98-102.
- Jameson, G. W., Roberts, D. V., Adams, R. W., Kyle, W. S., and Elmore, D. T. (1973) Determination of the operational molarity of solutions of bovine alpha-chymotrypsin, trypsin, thrombin and factor Xa by spectrofluorimetric titration. *Biochem. J.* **131**(1), 107-117.

- Jeong, S., and Lee, S. W. (2007) Expression and purification of recombinant active prostate-specific antigen from *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**(5), 840-846.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2002) The open pore conformation of potassium channels. *Nature* **417**(6888), 523-526.
- Jones, J. M., Creeth, J. M., and Kekwick, R. A. (1972) Thio reduction of human 2 - macroglobulin. The subunit structure. *Biochem. J.* **127**(1), 187-197.
- Juliano, M. A., and Juliano, L. (1985) Synthesis and kinetic parameters of hydrolysis by trypsin of some acyl-arginyl-p-nitroanilides and peptides containing arginyl-p-nitroanilide. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **18**(4), 435-445.
- Kaestner, K. H., Lee, C. S., Scearce, L. M., Brestelli, J. E., Arsenlis, A., Le, P. P., Lantz, K. A., Crabtree, J., Pizarro, A., Mazzarelli, J., Pinney, D., Fischer, S., Manduchi, E., Stoeckert, C. J., Jr., Gradwohl, G., Clifton, S. W., Brown, J. R., Inoue, H., Cras-Meneur, C., and Permutt, M. A. (2003) Transcriptional program of the endocrine pancreas in mice and humans. *Diabetes* **52**(7), 1604-1610.
- Kahn, M. L., Zheng, Y. W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D., Moff, S., Farese, R. V., Jr., Tam, C., and Coughlin, S. R. (1998) A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* **394**(6694), 690-694.
- Kahne, D., and Still, W. C. (1988) Hydrolysis of a peptide bond in neutral water. *J. Am. Chem. Soc.* **110**(22), 7529-7534.
- Kang, J., Wiegand, U., and Müller-Hill, B. (1992) Identification of cDNAs encoding two novel rat pancreatic serine proteases. *Gene* **110**(2), 181-187.
- Kaslik, G., Kardos, J., Szabó, E., Szilágyi, L., Závodszy, P., Westler, W. M., Markley, J. L., and Gráf, L. (1997) Effects of serpin binding on the target proteinase: global stabilization, localized increased structural flexibility, and conserved hydrogen bonding at the active site. *Biochemistry* **36**(18), 5455-5464.
- Kaslik, G., Patthy, A., Bálint, M., and Gráf, L. (1995) Trypsin complexed with alpha 1-proteinase inhibitor has an increased structural flexibility. *FEBS Lett.* **370**(3), 179-183.
- Katona, G., Berglund, G. I., Hajdu, J., Gráf, L., and Szilágyi, L. (2002) Crystal structure reveals basis for the inhibitor resistance of human brain trypsin. *J. Mol. Biol.* **315**(5), 1209-1218.
- Kawano, N., Osawa, H., Ito, T., Nagashima, Y., Hirahara, F., Inayama, Y., Nakatani, Y., Kimura, S., Kitajima, H., Koshikawa, N., Miyazaki, K., and Kitamura, H. (1997) Expression of gelatinase A, tissue inhibitor of metalloproteinases-2, matrilysin, and trypsin(ogen) in lung neoplasms: an immunohistochemical study. *Hum. Pathol.* **28**(5), 613-622.
- Khan, A. R., and James, M. N. (1998) Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* **7**(4), 815-836.
- Kirchhofer, D., Lipari, M. T., Santell, L., Billeci, K. L., Maun, H. R., Sandoval, W. N., Moran, P., Ridgway, J., Eigenbrot, C., and Lazarus, R. A. (2007) Utilizing the activation mechanism of serine proteases to engineer hepatocyte growth factor into a Met antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**(13), 5306-5311.
- Koivunen, E., Huhtala, M. L., and Stenman, U. H. (1989) Human ovarian tumor-associated trypsin. Its purification and characterization from mucinous cyst fluid and identification as an activator of pro-urokinase. *J. Biol. Chem.* **264**(24), 14095-14099.
- Koivunen, E., Itkonen, O., Halila, H., and Stenman, U. H. (1990) Cyst fluid of ovarian cancer patients contains high concentrations of trypsinogen-2. *Cancer. Res.* **50**(8), 2375-2378.

- Kong, W., McConalogue, K., Khitin, L. M., Hollenberg, M. D., Payan, D. G., Bohm, S. K., and Bunnett, N. W. (1997) Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**(16), 8884-8889.
- Koshikawa, N., Hasegawa, S., Nagashima, Y., Mitsushashi, K., Tsubota, Y., Miyata, S., Miyagi, Y., Yasumitsu, H., and Miyazaki, K. (1998) Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. *Am. J. Pathol.* **153**(3), 937-944.
- Koshikawa, N., Nagashima, Y., Miyagi, Y., Mizushima, H., Yanoma, S., Yasumitsu, H., and Miyazaki, K. (1997) Expression of trypsin in vascular endothelial cells. *FEBS Lett.* **409**(3), 442-448.
- Koshikawa, N., Yasumitsu, H., Umeda, M., and Miyazaki, K. (1992) Multiple secretion of matrix serine proteinases by human gastric carcinoma cell lines. *Cancer. Res.* **52**(18), 5046-5053.
- Kotormán, M., Laczkó, I., Szabó, A., and Simon, L. M. (2003). Effects of Ca<sup>2+</sup> on catalytic activity and conformation of trypsin and alpha-chymotrypsin in aqueous ethanol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**(1), 18-21.
- Kraut, J. (1977) Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 331-358.
- Kresge, A. J., More, O., and Powell, M. F. (1987) Solvent isotope effects, fractionation factors and mechanisms of proton transfer reactions. In "Isotopes in organic chemistry" (E. Buncl, and A. Lee, Eds.), pp. 177-273. Elsevier, Amsterdam.
- Kumazaki, T., Kajiware, K., Kojima, S., Miura, K., and Ishii, S. (1993) Interaction of Streptomyces subtilisin inhibitor (SSI) with Streptomyces griseus metalloendopeptidase II (SGMP II). *J. Biochem.* **114**(4), 570-575.
- Kuronizu, K., Shimokawa, Y., Abe, O., and Izumiya, N. (1985) New fluorogenic substrate for esterase activity of alpha-chymotrypsin and related enzymes. *Anal. Biochem.* **151**(2), 534-539.
- Kuzmič, P. (1996) Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* **237**(2), 260-273.
- Kühne, W. F. (1867) Über das Trypsin (Enzym des Pankreas). *Virchows Arch.* **39**, 130-134.
- LaBombardi, V. J., Shaw, E., DiStefano, J. F., Beck, G., Brown, F., and Zucker, S. (1983) Isolation and characterization of a trypsin-like serine proteinase from the membranes of Walker 256 carcino-sarcoma cells. *Biochem. J.* **211**(3), 695-700.
- LaMer, V. K., and Chittum, J. P. (1936) The conductance of salts (potassium acetate) and the dissociation constant of acetic acid in deuterium oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **58**(9), 1642-1644.
- Laskowski, M., Jr., and Kato, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 593-626.
- Laskowski, M., and Wu, F. C. (1953) Temporary inhibition of trypsin. *J. Biol. Chem.* **204**(2), 797-805.
- Lawrence, D. A., Ginsburg, D., Day, D. E., Berkenpas, M. B., Verhamme, I. M., Kvassman, J. O., and Shore, J. D. (1995) Serpin-protease complexes are trapped as stable acyl-enzyme intermediates. *J. Biol. Chem.* **270**(43), 25309-25312.
- Leatherbarrow, R. J. (1992) GraFit 3.3. Staines, U.K.: Erithacus Software Ltd.
- LeMosy, E. K., Hong, C. C., and Hashimoto, C. (1999) Signal transduction by a protease cascade. *Trends Cell. Biol.* **9**(3), 102-107.
- Lesk, A. M., and Fordham, W. D. (1996) Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. *J. Mol. Biol.* **258**(3), 501-537.

- Liu, Y. X. (2007) Involvement of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 in spermatogenesis, sperm capacitation, and fertilization. *Semin. Thromb. Hemost.* **33**(1), 29-40.
- Lopes, A. R., Juliano, M. A., Marana, S. R., Juliano, L., and Terra, W. R. (2006) Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36**(2), 130-140.
- Macfarlane, S. R., Seatter, M. J., Kanke, T., Hunter, G. D., and Plevin, R. (2001) Proteinase-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* **53**(2), 245-282.
- Magalhaes, A., Da Fonseca, B. C., Diniz, C. R., Gilroy, J., and Richardson, M. (1993). The complete amino acid sequence of a thrombin-like enzyme/gyroxin analogue from venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) *FEBS Lett.* **329**(1-2), 116-120.
- Mangel, W. F., Singer, P. T., Cyr, D. M., Umland, T. C., Toledo, D. L., Stroud, R. M., Pflugrath, J. W., and Sweet, R. M. (1990) Structure of an acyl-enzyme intermediate during catalysis: (guanidinobenzoyl)trypsin. *Biochemistry* **29**(36), 8351-8357.
- Marana, S. R., Lopes, A. R., Juliano, L., Juliano, M. A., Ferreira, C., and Terra, W. R. (2002) Subsites of trypsin active site favor catalysis or substrate binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**(1), 494-497.
- Mares, M., Meloun, B., Pavlik, M., Kostka, V., and Baudys, M. (1989) Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Lett.* **251**(1-2), 94-98.
- Maroux, S., and Desnuelle, P. (1969) On some autolyzed derivatives of bovine trypsin. *Biochim. Biophys. Acta.* **181**(1), 59-72.
- Mátrai, J., Verheyden, G., Krüger, P., and Engelborghs, Y. (2004) Simulation of the activation of alpha-chymotrypsin: analysis of the pathway and role of the propeptide. *Protein Sci.* **13**(12), 3139-3150.
- McPhalen, C. A., and James, M. N. (1988) Structural comparison of two serine proteinase-protein inhibitor complexes: eglin-c-subtilisin Carlsberg and CI-2-subtilisin Novo. *Biochemistry* **27**(17), 6582-6598.
- McRae, B. J., Kurachi, K., Heimark, R. L., Fujikawa, K., Davie, E. W., and Powers, J. C. (1981) Mapping the active sites of bovine thrombin, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa, plasma kallikrein, and trypsin with amino acid and peptide thioesters: development of new sensitive substrates. *Biochemistry* **20**(25), 7196-7206.
- Medveczky, P., Antal, J., Patthy, A., Kékesi, K., Juhász, G., Szilágyi, L., and Gráf, L. (2006) Myelin basic protein, an autoantigen in multiple sclerosis, is selectively processed by human trypsin 4. *FEBS Lett.* **580**(2), 545-552.
- Medveczky, P., Tóth, J., Gráf, L., and Szilágyi, L. (2003) The effect of Arg193 on the enzymatic properties of human brain trypsin. In "Protein structure-function relationship" (A. Abbasi, and S. A. Ali, Eds.). BCC&T Press, Karachi, Pakistan.
- Minn, A., Schubert, M., Neiss, W. F., and Müller-Hill, B. (1998) Enhanced GFAP expression in astrocytes of transgenic mice expressing the human brain-specific trypsinogen IV. *Glia* **22**(4), 338-347.
- Miyata, S., Miyagi, Y., Koshikawa, N., Nagashima, Y., Kato, Y., Yasumitsu, H., Hirahara, F., Misugi, K., and Miyazaki, K. (1998) Stimulation of cellular growth and adhesion to fibronectin and vitronectin in culture and tumorigenicity in nude mice by overexpression of trypsinogen in human gastric cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis.* **16**(7), 613-622.

- Moilanen, M., Sorsa, T., Stenman, M., Nyberg, P., Lindy, O., Vesterinen, J., Paju, A., Konttinen, Y. T., Stenman, U. H., and Salo, T. (2003) Tumor-associated trypsinogen-2 (trypsinogen-2) activates procollagenases (MMP-1, -8, -13) and stromelysin-1 (MMP-3) and degrades type I collagen. *Biochemistry* **42**(18), 5414-5420.
- Musil, D., Bode, W., Huber, R., Laskowski, M., Jr., Lin, T. Y., and Ardelt, W. (1991) Refined X-ray crystal structures of the reactive site modified ovomucoid inhibitor third domains from silver pheasant (OMSVP3\*) and from Japanese quail (OMJPQ3\*). *J. Mol. Biol.* **220**(3), 739-755.
- Nakagawa, Y., and Bender, M. L. (1970) Methylation of histidine-57 in alpha-chymotrypsin by methyl p-nitrobenzenesulfonate. A new approach to enzyme modification. *Biochemistry* **9**(2), 259-267.
- Nelson, W. E., and Butler, J. A. V. (1938) Experiments with heavy water on the acid hydrolysis of esters and the alkaline decomposition of diacetone alcohol. *J. Chem. Soc.*, 957-962.
- Németh, A. L., Medveczky, P., Tóth, J., Siklódi, E., Schlett, K., Patthy, A., Palkovits, M., Ovádi, J., Tökési, N., Németh, P., Szilágyi, L., and Gráf, L. (2007) Unconventional translation initiation of human trypsinogen 4 at a CUG codon with an N-terminal leucine. A possible means to regulate gene expression. *FEBS J.* **274**(6), 1610-1620.
- Neurath, H. (1984) Evolution of proteolytic enzymes. *Science* **224**(4647), 350-357.
- Nguyen, T. D., Moody, M. W., Steinhoff, M., Okolo, C., Koh, D. S., and Bunnett, N. W. (1999) Trypsin activates pancreatic duct epithelial cell ion channels through proteinase-activated receptor-2. *J. Clin. Invest.* **103**(2), 261-269.
- Nikai, T., Ohara, A., Komori, Y., Fox, J. W., and Sugihara, H. (1995) Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* **318**(1), 89-96.
- Northrop, J. H., and Kunitz, M. (1931) Isolation of protein crystals possessing tryptic activity. *Science* **73**(1888), 262-263.
- Nyaruhucha, C. N., Kito, M., and Fukuoka, S. I. (1997) Identification and expression of the cDNA-encoding human mesotrypsin(ogen), an isoform of trypsin with inhibitor resistance. *J. Biol. Chem.* **272**(16), 10573-10578.
- Nystedt, S., Emilsson, K., Larsson, A. K., Strombeck, B., and Sundelin, J. (1995) Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur. J. Biochem.* **232**(1), 84-89.
- O'Connell, A. R., and Stenson-Cox, C. (2007) A more serine way to die: defining the characteristics of serine protease-mediated cell death cascades. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**(10), 1491-1499.
- Ohta, T., Terada, T., Nagakawa, T., Tajima, H., Itoh, H., Fonseca, L., and Miyazaki, I. (1994) Pancreatic trypsinogen and cathepsin B in human pancreatic carcinomas and associated metastatic lesions. *Br. J. Cancer.* **69**(1), 152-156.
- Oikonomopoulou, K., Hansen, K. K., Saifeddine, M., Vergnolle, N., Tea, I., Diamandis, E. P., and Hollenberg, M. D. (2006) Proteinase-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs) by kallikreins and more. *Biol. Chem.* **387**(6), 677-685.
- Orr, W. J. C., and Butler, J. A. V. (1937) The kinetic and thermodynamic activity of protons and deuterons in water-deuterium oxide solutions. *J. Chem. Soc.*, 330-335.
- Ossovskaya, V. S., and Bunnett, N. W. (2004) Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol. Rev.* **84**(2), 579-621.



- Oyama, K., Ohta, T., Nishimura, G. I., Elnemr, A., Yasui, T., Fujimura, T., Fushida, S., Kitagawa, H., Kayahara, M., Terada, T., and Miwa, K. (2000) Trypsinogen expression in colorectal cancers. *Int. J. Mol. Med.* **6**(5), 543-548.
- Paju, A., Bjartell, A., Zhang, W. M., Nordling, S., Borgstrom, A., Hansson, J., and Stenman, U. H. (2000) Expression and characterization of trypsinogen produced in the human male genital tract. *Am. J. Pathol.* **157**(6), 2011-2021.
- Pasternak, A., Liu, X., Lin, T. Y., and Hedstrom, L. (1998) Activating a zymogen without proteolytic processing: mutation of Lys15 and Asn194 activates trypsinogen. *Biochemistry* **37**(46), 16201-16210.
- Pasternak, A., Ringe, D., and Hedstrom, L. (1999) Comparison of anionic and cationic trypsinogens: The anionic activation domain is more flexible in solution and differs in its mode of BPTI binding in the crystal structure. *Protein Sci.* **8**(1), 253-258.
- Pasternak, A., White, A., Jeffery, C. J., Medina, N., Cahoon, M., Ringe, D., and Hedstrom, L. (2001) The energetic cost of induced fit catalysis: Crystal structures of trypsinogen mutants with enhanced activity and inhibitor affinity. *Protein Sci.* **10**(7), 1331-1342.
- Pathy, L. (1990) Evolutionary assembly of blood coagulation proteins. *Semin. Thromb. Hemost.* **16**(3), 245-259.
- Payne, M. A., Neuenschwander, P. F., Johnson, A. E., and Morrissey, J. H. (1996) Effect of soluble tissue factor on the kinetic mechanism of factor VIIa: enhancement of p-guanidinobenzoate substrate hydrolysis. *Biochemistry* **35**(22), 7100-7106.
- Perona, J. J., and Craik, C. S. (1995) Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* **4**(3), 337-360.
- Plapp, B. V., Moore, S., and Stein, W. H. (1971) Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups. *J. Biol. Chem.* **246**(4), 939-945.
- Powers, J. C. (1977) Reaction of serine proteases with halomethyl ketones. *Methods. Enzymol.* **46**, 197-208.
- Pozsgay, M., Szabó, G., Bajusz, S., Simonsson, R., Gaspar, R., and Elődi, P. (1981) Investigation of the substrate-binding site of trypsin by the aid of tripeptidyl-p-nitroanilide substrates. *Eur. J. Biochem.* **115**(3), 497-502.
- Quinn, D. M., and Sutton, L. D. (1991) Theoretical basis and mechanistic utility of solvent isotope effects. In "Enzyme mechanism from isotope effects" (P. F. Cook, Ed.). CRC Press, Boston, MA.
- Radisky, E. S., and Koshland, D. E., Jr. (2002) A clogged gutter mechanism for protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**(16), 10316-10321.
- Radisky, E. S., Lee, J. M., Lu, C. J., and Koshland, D. E., Jr. (2006) Insights into the serine protease mechanism from atomic resolution structures of trypsin reaction intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**(18), 6835-6840.
- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J. (2000) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **28**(1), 323-325.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P., and Barrett, A. J. (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* **378**(Pt 3), 705-716.
- Richardson, J. L., Kroger, B., Hoeffken, W., Sadler, J. E., Pereira, P., Huber, R., Bode, W., and Fuentes-Prior, P. (2000) Crystal structure of the human alpha-thrombin-haemadin complex: an exosite II-binding inhibitor. *EMBO J.* **19**(21), 5650-5660.



- Rinderknecht, H., Renner, I. G., Abramson, S. B., and Carmack, C. (1984) Mesotrypsin: a new inhibitor-resistant protease from a zymogen in human pancreatic tissue and fluid. *Gastroenterology* **86**(4), 681-692.
- Rinderknecht, H., Renner, I. G., and Carmack, C. (1979) Trypsinogen variants in pancreatic juice of healthy volunteers, chronic alcoholics, and patients with pancreatitis and cancer of the pancreas. *Gut* **20**(10), 886-891.
- Rinderknecht, H., Renner, I. G., Carmack, C., Friedman, R., and Koyama, P. (1978) A new protease in human pancreatic juice. *Clin. Res.* **26**, 112A.
- Ritonja, A., Krizaj, I., Mesko, P., Kopitar, M., Lucovnik, P., Strukelj, B., Pungercar, J., Buttle, D. J., Barrett, A. J., and Turk, V. (1990) The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. *FEBS Lett.* **267**(1), 13-15.
- Roach, J. C., Wang, K., Gan, L., and Hood, L. (1997) The molecular evolution of the vertebrate trypsinogens. *J. Mol. Evol.* **45**(6), 640-652.
- Roughton, F. J. W. (1934) The kinetics of haemoglobin IV--General methods and theoretical basis for the reactions with carbon monoxide. The kinetics of haemoglobin V--The combination of carbon monoxide with reduced haemoglobin. The kinetics of haemoglobin VI--The competition of carbon monoxide and oxygen for haemoglobin. The kinetics of haemoglobin VII--Some notes on the reactivity of freshly reduced haemoglobin. *Proc. Roy. Soc. London B, Biol. Sci.* **115**, 475.
- Rowen, L., Koop, B. F., and Hood, L. (1996) The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* **272**(5269), 1755-1762.
- Rowen, L., Williams, E., Glusman, G., Linardopoulou, E., Friedman, C., Ahearn, M. E., Seto, J., Boysen, C., Qin, S., Wang, K., Kaur, A., Bloom, S., Hood, L., and Trask, B. J. (2005) Interchromosomal segmental duplications explain the unusual structure of PRSS3, the gene for an inhibitor-resistant trypsinogen. *Mol. Biol. Evol.* **22**(8), 1712-1720.
- Ryan, T. J., Fenton, J. W., 2nd, Chang, T., and Feinman, R. D. (1976) Specificity of thrombin: evidence for selectivity in acylation rather than binding for p-nitrophenyl alpha-amino-p-toluate. *Biochemistry* **15**(6), 1337-1341.
- Sahin-Tóth, M., Kukor, Z., and Nemoda, Z. (2006) Human cationic trypsinogen is sulfated on Tyr154. *FEBS J.* **273**(22), 5044-5050.
- Sakanari, J. A., Staunton, C. E., Eakin, A. E., Craik, C. S., and McKerrow, J. H. (1989) Serine proteases from nematode and protozoan parasites: Isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**(13), 4863-4867.
- Salameh, M. A., Soares, A. S., Hockla, A., and Radisky, E. S. (2008) Structural Basis for Accelerated Cleavage of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor (BPTI) by Human Mesotrypsin. *J. Biol. Chem.* **283**(7), 4115-4123.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2000) "Molecular cloning: A laboratory manual." Third Edition ed. Cold Spring Harbor Press.
- Sampson, N. S., and Bartlett, P. A. (1991) Peptidic phosphorylating agents as irreversible inhibitors of serine proteases and models of the tetrahedral intermediates. *Biochemistry* **30**(8), 2255-2263.
- Schechter, I., and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**(2), 157-162.
- Scheele, G., Bartelt, D., and Bieger, W. (1981) Characterization of human exocrine pancreatic proteins by two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Gastroenterology* **80**(3), 461-473.

- Schellenberger, V., Turck, C. W., Hedstrom, L., and Rutter, W. J. (1993) Mapping the S' subsites of serine proteases using acyl transfer to mixtures of peptide nucleophiles. *Biochemistry* **32**(16), 4349-4353.
- Schellenberger, V., Turck, C. W., and Rutter, W. J. (1994) Role of the S' subsites in serine protease catalysis. Active-site mapping of rat chymotrypsin, rat trypsin, alpha-lytic protease, and cercarial protease from *Schistosoma mansoni*. *Biochemistry* **33**(14), 4251-4257.
- Schmidt, A. E., Ogawa, T., Gailani, D., and Bajaj, S. P. (2004) Structural role of Gly(193) in serine proteases: investigations of a G555E (GLY193 in chymotrypsin) mutant of blood coagulation factor XI. *J. Biol. Chem.* **279**(28), 29485-29492.
- Scholten, J. D., Hogg, J. L., and Raushel, F. M. (1988) Methyl chymotrypsin catalyzed hydrolyses of specific substrate esters indicate multiple proton catalysis is possible with a modified charge relay triad. *J. Am. Chem. Soc.* **110**(24), 8246 - 8247.
- Schowen, K. B., Limbach, H. H., Denisov, G. S., and Schowen, R. L. (2000) Hydrogen bonds and proton transfer in general-catalytic transition-state stabilization in enzyme catalysis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1458**(1), 43-62.
- Schowen, R. L. (1977) In "Isotope effects on enzyme catalyzed reactions" (W. W. Cleland, M. H. O'Leary, and D. B. Northrup, Eds.), pp. 64-99. University Park Press, Baltimore.
- Schroeder, D. D., and Shaw, E. (1968) Chromatography of trypsin and its derivatives. Characterization of a new active form of bovine trypsin. *J. Biol. Chem.* **243**(11), 2943-2949.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M. C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* **31**(13), 3381-3385.
- Selvarajan, S., Lund, L. R., Takeuchi, T., Craik, C. S., and Werb, Z. (2001) A plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation. *Nat. Cell Biol.* **3**(3), 267-275.
- Shaw, G. L., Davis, B., Keeler, J., and Fersht, A. R. (1995) Backbone dynamics of chymotrypsin inhibitor 2: effect of breaking the active site bond and its implications for the mechanism of inhibition of serine proteases. *Biochemistry* **34**(7), 2225-2233.
- Shieh, T. C., Kawabata, S., Kihara, H., Ohno, M., and Iwanaga, S. (1988) Amino acid sequence of a coagulant enzyme, flavoxobin, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *J. Biochem.* **103**(4), 596-605.
- Sim, R. B., and Laich, A. (2000) Serine proteases of the complement system. *Biochem. Soc. Trans.* **28**(5), 545-550.
- Smith, R. L., and Shaw, E. (1969) Pseudotrypsin. A modified bovine trypsin produced by limited autodigestion. *J. Biol. Chem.* **244**(17), 4704-4712.
- Sorsa, T., Salo, T., Koivunen, E., Tynnela, J., Kontinen, Y. T., Bergmann, U., Tuuttila, A., Niemi, E., Teronen, O., Heikkila, P., Tschesche, H., Leinonen, J., Osman, S., and Stenman, U. H. (1997) Activation of type IV procollagenases by human tumor-associated trypsin-2. *J. Biol. Chem.* **272**(34), 21067-21074.
- Spomer, W. E., and Wootton, J. F. (1971) The hydrolysis of alpha-N-benzoyl-L-argininamide catalyzed by trypsin and acetyltrypsin. Dependence on pH. *Biochim. Biophys. Acta* **235**(1), 164-171.

- Sprang, S., Standing, T., Fletterick, R. J., Stroud, R. M., Finer-Moore, J., Xuong, N. H., Hamlin, R., Rutter, W. J., and Craik, C. S. (1987) The three-dimensional structure of Asn102 mutant of trypsin: role of Asp102 in serine protease catalysis. *Science* **237**(4817), 905-909.
- Stark, G. R., Stein, W. H., and Moore, S. (1960) Reactions of the cyanate present in aqueous urea with amino acids and proteins. *J. Biol. Chem.* **235**(11), 3177 - 3181.
- Szepessy, E., and Sahin-Tóth, M. (2006) Human mesotrypsin exhibits restricted S1' subsite specificity with a strong preference for small polar side chains. *FEBS J.* **273**(13), 2942-2954.
- Szilágyi, L., Kénesi, E., Katona, G., Kaslik, G., Juhász, G., and Gráf, L. (2001) Comparative in vitro studies on native and recombinant human cationic trypsins. Cathepsin B is a possible pathological activator of trypsinogen in pancreatitis. *J. Biol. Chem.* **276**(27), 24574-24580.
- Szmola, R., Kukor, Z., and Sahin-Tóth, M. (2003) Human mesotrypsin is a unique digestive protease specialized for the degradation of trypsin inhibitors. *J. Biol. Chem.* **278**(49), 48580-48589.
- Tani, T., Kawashima, I., Mita, K., and Takiguchi, Y. (1990) Nucleotide sequence of the human pancreatic trypsinogen III cDNA. *Nucleic. Acids. Res.* **18**(6), 1631.
- Terada, T., Ohta, T., Minato, H., and Nakanuma, Y. (1995) Expression of pancreatic trypsinogen/trypsin and cathepsin B in human cholangiocarcinomas and hepatocellular carcinomas. *Hum. Pathol.* **26**(7), 746-752.
- Tóth, J. (2006) Egy agyi szerin proteáz, a humán tripszin 4 funkcionális vizsgálata. Doktori értekezés. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest.
- Tóth, J., Gombos, L., Simon, Z., Medveczky, P., Szilágyi, L., Gráf, L., and Málnási-Csizmadia, A. (2006) Thermodynamic analysis reveals structural rearrangement during the acylation step in human trypsin 4 on 4-methylumbelliferyl 4-guanidinobenzoate substrate analogue. *J. Biol. Chem.* **281**(18), 12596-12602.
- Tóth, J., Siklódi, E., Medveczky, P., Gallatz, K., Németh, P., Szilágyi, L., Gráf, L., and Palkovits, M. (2007) Regional distribution of human trypsinogen 4 in human brain at mRNA and protein level. *Neurochem. Res.* **32**(9), 1423-1433.
- Tucker, H. M., Mottonen, J., Goldsmith, E. J., and Gerard, R. D. (1995) Engineering of plasminogen activator inhibitor-1 to reduce the rate of latency transition. *Nat. Struct. Biol.* **2**(6), 442-445.
- Uprichard, J., and Perry, D. J. (2002) Factor X deficiency. *Blood Rev.* **16**(2), 97-110.
- Urano, T., Urano, S., and Castellino, F. J. (1988) Reaction of tissue-type plasminogen activator with 4-methylumbelliferyl-p-guanidinobenzoate hydrochloride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**(1), 45-51.
- Vajda, T., and Náray-Szabó, G. (1988) Role of counter ions in trypsin acylation. NaCl effect. *Acta Biochim. Biophys. Hung.* **23**(2), 195-202.
- Vallee, F., Kadziola, A., Bourne, Y., Juy, M., Rodenburg, K. W., Svensson, B., and Haser, R. (1998) Barley alpha-amylase bound to its endogenous protein inhibitor BASI: crystal structure of the complex at 1.9 Å resolution. *Structure* **6**(5), 649-659.
- von Heijne, G. (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184**(1), 99-105.
- Walmsley, A. R., and Bagshaw, C. R. (1989) Logarithmic timebase for stopped-flow data acquisition and analysis. *Anal. Biochem.* **176**(2), 313-318.

- Walter, J., Steigemann, W., Singh, T. P., Bartunik, H., Bode, W., and Huber, R. (1982) On the disordered activation domain in trypsinogen: chemical labelling and low-temperature crystallography. *Acta Cryst.* **B38**, 1462-1472.
- Wang, K., Gan, L., Lee, I., and Hood, L. (1995) Isolation and characterization of the chicken trypsinogen gene family. *Biochem. J.* **307** (Pt 2), 471-479.
- Wang, Y., Luo, W., Wartmann, T., Halangk, W., Sahin-Tóth, M., and Reiser, G. (2006) Mesotrypsin, a brain trypsin, activates selectively proteinase-activated receptor-1, but not proteinase-activated receptor-2, in rat astrocytes. *J. Neurochem.* **99**(3), 759-769.
- Weiner, H., White, W. N., Hoare, D. G., and Koshland, D. E., Jr. (1966) The formation of anhydrochymotrypsin by removing the elements of water from the serine at the active site. *J. Am. Chem. Soc.* **88**(16), 3851-3859.
- West, J. B., Hennen, W. J., Lalonde, J. L., Bibbs, J. A., Zhong, Z., Meyer, E. F., and Wong, C. H., Jr. (1990) Enzymes as synthetic catalysts: mechanistic and active-site considerations of natural and modified chymotrypsin. *J. Am. Chem. Soc.* **112**(13), 5313-5320.
- Wiegand, U., Corbach, S., Minn, A., Kang, J., and Müller-Hill, B. (1993) Cloning of the cDNA encoding human brain trypsinogen and characterization of its product. *Gene* **136**(1-2), 167-175.
- Will, H., Atkinson, S. J., Butler, G. S., Smith, B., and Murphy, G. (1996) The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoprolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J. Biol. Chem.* **271**, 17119-17123.
- Williams, J. A. (2006) Regulation of pancreatic acinar cell function. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **22**(5), 498-504.
- Wroblewski, B., Diaz, J. F., Schlitter, J., and Engelborghs, Y. (1997) Modelling pathways of alpha-chymotrypsin activation and deactivation. *Protein Eng.* **10**(10), 1163-1174.
- Wulff, K., and Herrmann, F. H. (2000) Twenty two novel mutations of the factor VII gene in factor VII deficiency. *Hum. Mutat.* **15**(6), 489-496.
- Xu, W. F., Andersen, H., Whitmore, T. E., Presnell, S. R., Yee, D. P., Ching, A., Gilbert, T., Davie, E. W., and Foster, D. C. (1998) Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**(12), 6642-6646.
- Yamashita, K., Mimori, K., Inoue, H., Mori, M., and Sidransky, D. (2003) A tumor-suppressive role for trypsin in human cancer progression. *Cancer. Res.* **63**(20), 6575-6578.
- Ye, S., Cech, A. L., Belmares, R., Bergstrom, R. C., Tong, Y., Corey, D. R., Kanost, M. R., and Goldsmith, E. J. (2001) The structure of a Michaelis serpin-protease complex. *Nat. Struct. Biol.* **8**(11), 979-983.
- Zeeuwen, P. L. (2004) Epidermal differentiation: the role of proteases and their inhibitors. *Eur. J. Cell. Biol.* **83**(11-12), 761-773.
- Zemke, K. J., Muller-Fahrnow, A., Jany, K. D., Pal, G. P., and Saenger, W. (1991) The three-dimensional structure of the bifunctional proteinase K/alpha-amylase inhibitor from wheat (PK13) at 2.5 Å resolution. *FEBS Lett.* **279**(2), 240-242.
- Zerner, B., Bond, R. P. M., and Bender, M. L. (1964) Kinetic evidence for the formation of acyl-enzyme intermediates in the  $\alpha$ -chymotrypsin-catalyzed hydrolyses of specific substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **86**(18), 3674-3679.

- Zhang, D., and Kovach, I. M. (2005) Full and partial deuterium solvent isotope effect studies of alpha-thrombin-catalyzed reactions of natural substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **127**(11), 3760-3766.
- Zhang, Y., Wisner, A., Xiong, Y., and Bon, C. (1995) A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning. *J. Biol. Chem.* **270**(17), 10246-10255.
- Zhao, Y., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2004) A gating hinge in Na<sup>+</sup> channels; a molecular switch for electrical signaling. *Neuron* **41**(6), 859-865.